UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE
Année Scolaire 1945-1946. — Série E N° 12

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ACTION DE DIVERS ANESTHESIQUES LOCAUX SUR UN ORGANISME VIVANT

(GASTEROSTEUS ACULEATUS)

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DOCTORAT D'ETAT)

Présentée et soutenue le 27 Juin 1946

PAR

RENÉE SITRI
EX-INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

JURY

MM. MASCRE Président
G. VALETTE, Professeur
R. DAVID, Maître de conférences.

LYON
IMPRIMERIE COMMERCIALE DU NOUVELLISTE
14, rue de la Charité
1946

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ACTION DE DIVERS ANESTHÉSIQUES LOCAUX SUR UN ORGANISME VIVANT

(GASTEROSTEUS ACULEATUS)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550021_0016

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE
Année Scolaire 1945-1946. — Série E N° 12

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ACTION DE DIVERS ANESTHÉSIQUES LOCAUX SUR UN ORGANISME VIVANT

(GASTEROSTEUS ACULEATUS)

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DOCTORAT D'ETAT)

Présentée et soutenue le 27 Juin 1946

PAR

RENÉE SITRI
EX-INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

JURY

MM.	MASCRE	Président
	G. VALETTE,	Professeur
	R. DAVID,	Maître de conférences.

LYON
IMPRIMERIE COMMERCIALE DU NOUVELLISTE
14, rue de la Charité
1946

* *

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM.	DAMIENS,	Doyen, O. ✻, ✪ I.
	SOMMELET,	Assesseur, ✻, ✪ I.
	H.-J. LIONNET,	Secrétaire, ✪ I.

PROFESSEURS

MM.	DAMIENS, O. ✻, ✪ I.	Chimie minérale.
	SOMMELET, ✻, ✪ I.	Chimie organique.
	FABRE, ✻, ✪ I.	Toxicologie.
	DELABY, ✻, ✪ I	Pharmacie chimique.
	PICON, ✻, ✪ I.	Physique.
	MASCRE, ✻, ✪ I.....	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
	N.....	Botanique générale.
	FLEURY, ✪ I.	Chimie biologique.
	RÉGNIER † ✪ I.....	Microbiologie.
	JANOT, ✪ A.....	Pharmacie galénique.
	CHARONNAT, ✪ I.....	Chimie analytique.
	VALETTE, ✪ A.	Zoologie appliquée.
	BEDEL ✻, ✪ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	GUILLOT	Professeurs sans chaire.
	PARIS	

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✻, ✪ I. — GUERIN, O. ✻, ✪ I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. ✻, ✪ I., et LEBEAU, O. ✻, ✪ I, Membres de l'Institut.

PERROT, O. ✻, ✪ I., COUTIERE, O. ✻, ✪ I.
BOUGAULT, O. ✻, ✪ I., LUTZ, ✻, ✪ I.
GORIS, O. ✻, ✪ I., HERISSEY, O. ✻, ✪ I.
LAUNOY, O. ✻, ✪ I.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	GAUTIER.....	Sciences physiques.
	RAOUL	Sciences naturelles.
	DAVID ✪ I.	Sciences naturelles.
	DOMANGE	Sciences physiques et chimiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM.	N....., trav. pratiques de 1re année	Chimie générale et pharmaceutique.
	MORETTE, trav. pratiques de 2e et 3e année	Chimie analytique.
	CRETE	Micrographie.
	CORRIEZ, ✪ A.....	Physique.
	Mlle LAMBIN, ✪ A.	Microbiologie.
	COURTOIS	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ✪ A.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✪ A.

A LA MEMOIRE DE MON FRERE

A MON PERE

Officier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre

ET

A MA MERE

A MON FRÈRE ET A MES SŒURS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A LA MÉMOIRE DE

MONSIEUR J. RÉGNIER

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

A qui je dois le sujet de ce travail et dont les conseils éclairés m'ont permis de mener cette tâche à bien.

En pieux hommage de ma sincère reconnaissance et mon souvenir respectueusement fidèle.

A Monsieur M. MASCRÉ

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hopitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

En hommage de ma sincère et respectueuse gratitude.

A Monsieur R. DAVID

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

Dont les bienveillants conseils m'ont été de précieux encouragements.

En témoignage de mon affectueuse reconnaissance.

A Monsieur G. VALETTE

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

Qui me fait l'honneur de faire partie du jury de cette thèse.

En hommage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur L.-JUSTIN-BESANÇON

Professeur à la Faculté de Médecine
Médecin des Hôpitaux
Président honoraire de la Croix-Rouge Française
Officier de la Légion d'Honneur

Qui m'a toujours apporté l'appui de sa grande érudition et de sa foi en la recherche.

En hommage de mon affectueuse et profonde reconnaissance.

INTRODUCTION

Un grand nombre de travaux consacrés à l'étude des anesthésiques locaux ont eu pour effet de déterminer les différents facteurs qui interviennent dans les variations de leur activité dans la pratique clinique.

La diversité d'action de ces drogues peut provenir de différences dans leur constitution chimique, certains radicaux modifiant le pouvoir anesthésique, les uns en l'exaltant, les autres, au contraire, en le diminuant ; elle peut provenir aussi de l'influence d'un grand nombre de facteurs accessoires : température, réaction du milieu, tension superficielle, liposolubilité, etc.

Pour les essais des anesthésiques locaux, on a utilisé les réactifs biologiques les plus divers : les chiens, par injections sous-cutanées ou par action sur la cornée ; les chats, les lapins, les cobayes par perfusion du cœur, anesthésie rachidienne, action sur la cornée ; les grenouilles, par action sur les cellules sensibles de la peau, les têtards, les poissons. On a également employé des préparations de nerfs ou de muscles de grenouilles ou d'autres animaux et on a enfin entrepris quelques essais sur l'homme, par action sur la langue, les gencives, ou infiltration sous-épidermique.

Les travaux de J. Regnier et de ses collaborateurs ont mis en évidence l'influence de différents facteurs sur l'activité des anesthésiques locaux : température, pH, tension superficielle, influence de l'acide salifiant la base.

Dès 1923, J. Regnier [110] avait mis au point une méthode de mesure des pouvoirs anesthésiques, en utilisant la cornée de lapin. Grâce à cette technique, il constata d'abord le renforcement des effets anesthésiques résultant de l'alca-

linisation des solutions de cocaïne [106-107]. Poursuivant ses recherches, il fut amené à montrer avec R. David [113-114] le rôle joué par l'acide dans l'activité des différents sels de cocaïne et de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Ces essais poursuivis avec R. David, A. Quevauviller, S. Bazin, R. Delange et L. Fourault [108-109-111-115-116-117-118-119-120-121-48], en utilisant des techniques diverses : anesthésie de la cornée de lapin, action sur la chronaxie des nerfs moteurs ou sensitifs, action sur les cellules sensibles de la peau de grenouille, action sur les cellules d'un mycelium *(Ascoïdea rubescens)* ou sur des cellules végétales *(Elodea canadensis)*, ont confirmé les premier résultats.

Enfin, avec H. Cardot [112] et G. Valette [122], il a cherché à déterminer les pouvoirs anesthésiques comparés du chlorhydrate de cocaïne et d'un certain nombre de ses succédanés synthétiques, en utilisant des techniques diverses (cornée de lapin, sciatique de grenouille, nerf lingual du chien).

Ces différents travaux ont conduit J. Régnier à conclure que les anesthésiques réagissent de façons différentes selon les appareils nerveux considérés, et qu'il est nécessaire, pour déterminer l'activité anesthésique d'un produit, d'utiliser de nombreuses techniques.

Dans le but de compléter ses recherches concernant les essais comparatifs de plusieurs succédanés synthétiques de la cocaïne, J. Régnier nous a conseillé d'appliquer à l'étude de divers anesthésiques locaux un nouveau réactif biologique : le poisson.

Les poissons ont été choisis par plusieurs auteurs pour l'étude pharmacodynamique de nombreux produits : substances toxiques et drogues diverses : sels métalliques, alcaloïdes, extraits végétaux, médicaments hypnotiques et quelques anesthésiques. Ce choix présente un certain nombre d'avantages. C'est un fait classique, reconnu par Claude Bernard, que la « voie d'introduction » des poisons a une grande influence sur l'intensité de leur action. H. Roger a

renouvelé et confirmé cette doctrine en fournissant de nouvelles preuves expérimentales. Il a montré que le foie et le poumon possèdent un pouvoir d'arrêt et de transformation pour un grand nombre de poisons, ceux-ci exerçant le maximum d'effet quand la substance toxique arrive d'emblée dans le système capillaire artériel qui est, d'après l'expression même de Claude Bernard, « le champ d'action » des poisons, sans que cette substance ait traversé le foie ou d'autres organes qui peuvent l'immobiliser, le neutraliser ou l'éliminer en partie.

Il semble que les poissons offrent des dispositions anatomiques favorables à ces conditions : l'absorption se fait au niveau des branchies ; les troubles qui en résultent rappellent une intoxication par voie pulmonaire et par voie veineuse. L'oreillette unique du cœur collecte le sang veineux de tous les organes, le chasse dans le ventricule qui l'envoie dans les capillaires des branchies où il s'artérialise avant de gagner les différents organes.

Si la substance dissoute dans l'eau pénètre à travers les branchies, elle sera donc portée directement aux éléments anatomiques par les capillaires artériels, et le poison exercera son action dans les conditions les plus efficaces. Les vaisseaux efférents de l'appareil branchial aboutissant aux racines aortiques qui se réunissent pour former le cercle artériel céphalique d'où naissent les artères de la tête, les substances absorbées atteindront très rapidement la système nerveux central.

On peut donc penser, *à priori*, que, chez le poisson, le maximum d'effet sera obtenu en immergeant les animaux dans des solutions de la drogue à essayer.

D'après L. Launoy [73], l'absorption des substances dissoutes se fait effectivement au niveau des branchies et l'intoxication rappelle une intoxication par voie pulmonaire ou par voie veineuse. Cet auteur signale en outre que, d'après Chamkovic, la peau des poissons d'eau douce est susceptible d'absorber les substances dissoutes dans l'eau ; l'absorption se ferait par toute la surface du corps.

Il nous a semblé intéressant d'étudier, par cette méthode l'action du chlorhydrate de cocaïne et de quelques-uns de ses succédanés synthétiques, afin de vérifier, si possible, les résultats trouvés par J. RÉGNIER et ses collaborateurs, grâce à des techniques différentes.

Nous nous sommes adressés, pour cette étude, à un poisson d'eau douce : *Gasterosteus aculeatus* (épinoche).

Notre but a été, tout d'abord, de mettre au point une technique personnelle, en tenant compte de celles antérieurement utilisées par les divers auteurs.

Nous avons ensuite cherché à vérifier par cette méthode les résultats de J. RÉGNIER et de ses collaborateurs, concernant l'influence de la réaction et de la température sur l'action du chlorhydrate de cocaïne et des sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, ainsi que l'influence de l'acide salifiant la base sur l'action de ces sels.

Après avoir étudié ces différents problèmes, nous avons entrepris une série d'essais comparatifs avec d'autres succédanés synthétiques de la cocaïne : stovaïne, delcaïne, percaïne pantocaïne, butelline, tutocaïne.

Les faits observés dans ces différents essais nous ont amenés à compléter les notions antérieurement admises concernant l'action des anesthésiques locaux sur les poissons. En effet les différents auteurs qui ont utilisé ces animaux pour de telles mesures n'ont, en général, envisagé que l'action « anesthésique » de ces produits. Or, nos recherches nous ont montré qu'il n'était pas toujours possible d'attribuer à une seule action anesthésique les phénomènes observés. Il nous a donc paru nécessaire de chercher à déterminer quelle était la véritable action de ces drogues : action anesthésique, action toxique, ou superposition de ces deux phénomènes, et à vérifier s'il était possible d'utiliser, pour la mesure comparative des anesthésiques locaux, les techniques préconisées antérieurement par d'autres auteurs.

Dans un PREMIER CHAPITRE nous exposerons les travaux antérieurs entrepris dans des buts divers, ayant utilisé des poissons comme réactif biologique, afin de dégager les élé-

ments qui nous permettront de mettre au point une technique rationnelle.

La suite de notre travail sera consacrée à nos essais personnels.

Dans le DEUXIÈME CHAPITRE, nous décrirons nos expériences effectuées avec le chlorhydrate de cocaïne dans le but de mettre au point une technique susceptible d'être utilisée ultérieurement pour l'étude de l'action des anesthésiques locaux, cocaïne et succédanés synthétiques, sur *Gasterosteus aculeatus* (épinoche). Nous envisagerons les conditions expérimentales générales et plus particulièrement l'influence de la température, de la réaction du milieu et de la concentration sur l'action de ces anesthésiques.

Dans un TROISIÈME CHAPITRE nous utiliserons la technique établie avec le chlorhydrate de cocaïne pour l'étude du chlorhydrate, du phénylpropionate, du citrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol (base de la novocaïne).

Dans le QUATRIÈME CHAPITRE enfin, nous comparerons plusieurs succédanés synthétiques de la cocaïne : novocaïne, tutocaïne, butelline, delcaïne, stovaïne, pantocaïne et percaïne sur les poissons, et nous nous efforcerons de déterminer le mode d'action de ces anesthésiques locaux sur *Gasterosteus aculeatus* (épinoche).

Ce travail a été effectué au Laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital BICHAT.

Monsieur J. RÉGNIER, Professeur à la Faculté de Pharmacie, Pharmacien des Hôpitaux, à qui nous devons le sujet de ce travail, n'a cessé de nous prodiguer ses encouragements et ses conseils éclairés. Nous déplorons que son décès prématuré nous prive de l'honneur de l'avoir comme Président du Jury de cette thèse.. Nous garderons à sa mémoire un fidèle et respectueux attachement.

Nous sommes particulièrement honorée que Monsieur le Professeur M. MASCRÉ, Pharmacien des Hôpitaux, ait accepté de présider le Jury de cette thèse.

Nous sommes tout particulièrement heureuse de pouvoir le remercier des conseils qu'il nous a prodigués au cours de son enseignement, conseils qui nous ont incitée à préparer l'Internat des Hôpitaux et ont décidé de notre orientation.

A Monsieur R. David, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie, Pharmacien des Hôpitaux, va notre affectueuse reconnaissance. Pendant le temps de notre Internat, et au cours des années qui ont suivi, dans les bons comme dans les mauvais jours, il nous a constamment témoigné un intérêt bienveillant. Nous le prions de croire à notre fidèle attachement.

Que Monsieur le Professeur G. Valette, Pharmacien des Hôpitaux, veuille également trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

CHAPITRE PREMIER

UTILISATION DES POISSONS DANS LES ESSAIS BIOLOGIQUES

Les différents travaux de laboratoire pour lesquels les poissons ont été utilisés ont visé des buts divers. Dans une première catégorie nous pouvons grouper les essais destinés à apporter des notions supplémentaires à l'étude de la physiologie des animaux marins (étude des réactions des animaux vis-à-vis des variations des milieux dans lesquels ils vivent naturellement, ou dans lesquels on les contraint à vivre : variations de la nature de l'eau, de la salinité, de la température, etc.). Dans les autres essais, au contraire, le poisson n'est que le réactif, « réactif biologique », pour des recherches de pharmacodynamie et de toxicologie.

Un grand nombre d'auteurs ont en effet montré que les poissons sont d'excellents réactifs de certains médicaments, en particulier des hypnotiques et des anesthésiques. Il nous a paru intéressant de passer en revue ces différents travaux, afin d'en tirer les éléments utiles pour la technique que nous désirons mettre au point.

I) Travaux antérieurs

Ch. Richet, [124], en 1881 a le mérite d'avoir, le premier, mis en valeur les grands avantages que présente l'emploi des animaux à sang-froid, comme les poissons, pour des essais de drogues, médicaments et toxiques.

Dans ses expériences s'étendant sur plusieurs années (1883 à 1893), [123-125-126-127-128-129] il a donné un grand nombre de précisions, tant sur les réactions des poissons vis-à-vis des drogues essayées que sur la technique utilisée.

Tout d'abord, il a déterminé les conditions compatibles avec la vie des poissons dans les milieux artificiels.

Dans ses essais, il a constaté que le milieu confiné dans lequel vit le poisson, au laboratoire, devient toxique par suite d'absence d'oxygène et présence de gaz carbonique. En effet, les poissons de poids supérieur à cent grammes meurent en quelques heures dans trois litres d'eau, alors que la survie est indéfinie pour des poissons plus petits. La forme des récipients intervient également : pour des volumes égaux, des poissons meurent dans une éprouvette alors qu'ils survivent dans un cristallisoir à large surface.

D'autre part, Ch. Richet a étudié l'influence de l'acidité ou de l'alcalinité du milieu sur la vie des poissons en additionnant l'eau dans laquelle ils évoluent de différents acides (acide sulfurique, acide nitrique, acide acétique), ou de soude, et en déterminant les concentrations extrêmes qui permettent leur survie : « les poissons ne peuvent vivre que dans un milieu neutre, ou tout au moins un milieu dont la basicité soit, au maximum, équivalente à 0,05 pour mille d'oxyde de calcium, ou dont l'acidité ne dépasse pas, en poids, la quantité susceptible de saturer 0 g. 05 pour mille d'oxyde de calcium. »

Un certain nombre d'essais consacrés à l'étude de l'action sur les poissons de plusieurs sels de métaux lourds : mercure, cadmium, cuivre, et de métaux alcalins : potassium et sodium, ont permis à Ch. Richet de démontrer l'action toxique des sels de mercure, de cadmium et de cuivre sur ces animaux, action variant dans le même sens que la concentration.

Les sels de potassium sont, eux aussi, toxiques. En effet, à une température de 15° à 17° la durée de vie des poissons est de 40 minutes, 140 minutes et 175 minutes,

dans des solutions contenant respectivement 10 g. pour 1000, 5 g. pour 1.000 et 2 g. 5 pour 1.000 de chlorure de potassium. A une température variant de 24° à 26°, ces temps de survie sont de 21 minutes, 47 minutes et 150 minutes, dans des solutions de mêmes concentrations. Le poison agit donc d'autant plus rapidement que la température est plus élevée. Des résultats analogues ont été obtenus avec le chlorure de cadmium.

Par contre, les poissons supportent sans inconvénient des concentrations de 2 g. pour 1.000 de sodium, quand ce métal est combiné à un acide non toxique par lui-même.

Dans ses recherches sur la toxicité des différents sels pour les poissons, Ch. Richet a évalué cette toxicité en mesurant la durée de survie des animaux. Il a été conduit à admettre qu'une solution dans laquelle les poissons peuvent vivre 24 heures ou 48 heures est dénuée de toute toxicité, et que les poissons pourraient y vivre indéfiniment, ce qui lui a permis de préciser, d'une part les concentrations limites non toxiques de ces sels, d'autre part les conditions de milieu compatibles avec la vie des poissons.

Il a pu constater en outre, dans une étude sur la durée des phénomènes réflexes dans l'anémie chez les poissons, que la partie la plus sensible chez ces animaux est l'extrémité de la queue, où les réflexes sont le plus longtemps conservés.

Les poissons ont ensuite maintes fois servi pour l'essai de nombreuses drogues et composés toxiques.

Dès 1883, A. Clopinsky [36] les a utilisés pour l'étude de la picrotoxine, étude reprise par un grand nombre d'auteurs : G. Dragendorff [45], en 1895 ; Goupil [56] en 1907, qui a signalé une grande différence de sensibilité des diverses espèces de poissons à ce toxique, puis W. Autenreith (1921-1923) [2], S. S. Cohen et T. S. Githens (1928) [37], et enfin H. Fuhner, en 1928 [51].

En 1885, nous trouvons pour la première fois l'utilisation des poissons pour l'étude d'un anesthésique.

Dans ses expériences, P. Régnard [104] a, en effet, immergé des cyprins dans une solution de chlorhydrate de cocaïne, et décrit une série de phénomènes assez particuliers qu'il a observés : l'animal s'agite vivement d'abord, puis respire avec une grande rapidité. Au bout d'un certain temps il se trouve sur le flanc, monte à la surface de l'eau, puis, tout d'un coup, cesse de respirer : la bouche demeure fermée, les ouïes immobiles. L'animal est inerte, paralysé de tous les muscles ; il apparaît comme mort. Si on le remet dans l'eau pure, il reste en état de mort apparente pendant plusieures heures, puis la respiration recommence, et l'animal revient à son état primitif.

Par l'analyse des gaz de l'eau, l'auteur a pu constater que la respiration a été aussi nulle chimiquement qu'elle paraissait l'être physiquement. Ayant cherché à quoi attribuer cet état particulier, il a admis « qu'il est peu probable que ce soit une action générale de la cocaïne sur la peau, car des grenouilles plongées dans la même solution sont anesthésiées, mais ne manifestent pas la mort apparente » et il a pensé, à priori « qu'il s'agit d'une anesthésie des nerfs branchiaux, d'où abolition du réflexe respiratoire, et suppression, par cela même des mouvements des ouïes et de la bouche. Les mouvements reprendraient quand la cocaïne serait éliminée. Au contraire, si on maintient le poisson dans la solution de cocaïne, il finit par succomber, sans qu'on puisse voir à quel moment. »

Un peu plus tard, M. A. Dissard (1893) [43], a entrepris une étude des phénomènes anesthésiques sur les vertébrés aquatiques. Afin d'éliminer l'influence des poumons sur les substances mises en œuvre, il s'est adressé aux poissons, animaux privés de ces organes. Placés dans une solution d'éther à 10 %, « les poissons se couchent sur le flanc, l'anesthésie se produit, puis la mort survient au bout d'un certain temps ». Ses observations ont amené M. A. Dissard à conclure que les substances anesthésiques, pour pénétrer dans la circulation, ne passent que par l'ectoderme.

Il a ensuite recherché, avec J. Noé (1894)[44], de quels facteurs dépend la résistance des poissons aux toxiques.

Opérant sur un grand nombre d'espèces soumises à l'action de la vératrine, du sulfate de strychnine, ou de divers anesthésiques, ces auteurs ont constaté qu'il y a une très grande différence de résistance entre les diverses espèces, cette résistance étant fonction de l'habitat, et se trouvant plus grande pour les poissons sédentaires que pour les poissons migrateurs : ce qui confirme une constatation faite antérieurement par Ch. Richet.

Parmi les nombreux travaux qui ont eu pour but l'étude de l'influence des variations du milieu sur la physiologie des poissons, il est intéressant de citer ceux de Maurel et Lagriffe (1899) [87-88-89] qui ont apporté de grandes précisions sur les températures limites compatibles avec la vie de plusieurs espèces de poissons :

1°) l'existence de ces animaux n'est possible qu'à une température inférieure à 30°, avec un optimum compris entre 12° et 15° selon l'espèce considérée ;

2°) les poissons sont mieux organisés pour résister aux basses températures ;

3°) enfin, il est probable que cette grande sensibilité à des variations de température explique certains faits dans leurs manières de vivre telles que habitat, migration, etc.

Ces auteurs ont constaté en outre, que les phénomènes observés lors de l'abaissement de la température sont la reproduction exacte de ceux observés, sur les mêmes animaux, sous l'influence des hautes températures. Leurs recherches pour expliquer ces divers phénomènes les ont conduits à penser que la mort ne peut avoir pour cause la rigidité des muscles de la vie de relation, et du cœur ; qu'il est impossible d'attribuer ces effets à une auto-intoxication, et qu'il est probable qu'il s'agit de modifications physiques de certains éléments histologiques.

En 1901, M. Cololian [39] a repris les essais de Ch. Richet concernant l'action de différents sels de sodium sur les poissons.

Contrairement à Ch. Richet qui avait limité ses essais

aux poissons de mer, M. Cololian a étendu les siens aux poissons d'eau douce, et a pu mettre en évidence que la réaction des poissons de mer et des poissons d'eau douce aux différents poisons est la même. Cette homologie est frappante pour certains sels tels que le sulfate, le bromure, l'iodure et le citrate de sodium. Toutefois, comme il fallait s'y attendre, il apparaît une très grande différence dans la toxicité du chlorure de sodium dont il faut 70 g. pour 1.000 pour tuer un poisson de mer, alors qu'il suffit de 12 g. pour 1000 pour un poisson d'eau douce.

Nous verrons que ces recherches concernant l'action des variations de salinité du milieu sur la physiologie des poissons donneront lieu plus tard à un grand nombre d'autres travaux.

En 1901, Em. Hédon [64] a, le premier, utilisé les poissons pour l'études des glucosides globulicides. Ses essais lui ont permis de mettre en évidence l'action favorisante de l'alcalinité sur la toxicité de ces glucosides pour ces animaux.

Les plantes à saponines étant souvent utilisées comme appât pour les poissons, Priess et H. Steglitz [103] eurent, eux aussi, en 1911, l'idée d'utiliser ces animaux comme réactif biologique pour l'étude de ces drogues. Des essais similaires ont été effectués depuis par L. Koffler et W. Schrutka (1925), [72], par H. H. Meyer et W. Gottlieb (1926) [91] et par T. Sollmann (1928) [141].

En 1913, L. Disque [42] utilisa ces mêmes animaux pour l'étude de la podophyllotoxine ; et G. Heinrich [65] un peu plus tard détermina de la même façon l'action des produits extraits du jalap.

En 1914, S. Ledebt [74], dans une très intéressante contribution à l'étude des propriétés biologiques des venins de serpents et de leur action sur les vertébrés aquatiques a été amenée à préciser les facteurs qui conditionnent la vie de ces animaux.

Elle a envisagé en effet, non seulement la série des phénomènes qui caractérisent la présence des poisons dans l'or-

ganisme, mais encore tous ceux qui interviennent pour faciliter ou empêcher leur absorption, soit au niveau de l'appareil branchial, soit au niveau du tégument. Or, des variations relativement minimes de la composition du milieu peuvent avoir, à cet égard, une importance considérable, soit qu'elles modifient les conditions des échanges, soit qu'elles altèrent la barrière épithéliale, soit qu'elles agissent directement dans le milieu, sur le poison, pour le neutraliser ou le détruire.

Elle a pu aussi constater que les substances minérales, et en particulier certains sels, peuvent, à ce point de vue, exercer une action importante, et elle a précisé le rôle que jouent ces substances en déterminant comment elles se comportent, isolément ou en association, mais indépendamment de la présence du poison.

Une série de recherches concernant la nature de l'eau qu'il faut utiliser a permis à S. Ledebt d'admettre que l'eau distillée, évidemment très toxique pour les animaux marins, ne peut convenir à un assez grand nombre d'espèces d'eau douce. En effet, divers poissons d'eau douce, vairons, goujons, tanches, sont capables de vivre très longtemps dans de l'eau de conduite, même sans nourriture et sans précautions spéciales d'aération, alors que, par contre, ils meurent en cinq à six heures, et même dans un temps inférieur à une heure pour les vairons, lorsqu'on les place dans l'eau distillée. Les phénomènes toxiques observés sont d'abord le ralentissement des mouvements suivi de l'immobilité et d'une véritable paralysie : puis la respiration s'arrête, le cœur continuant à battre. Il y a une importante desquamation du tégument, et l'on retrouve dans l'eau des débris épithéliaux en plus ou moins grande abondance.

S. Ledebt a cherché à déterminer la cause de cette action toxique de l'eau distillée, attribuée par E. P. Lyon à l'ammoniaque, à la suite de ses travaux sur les œufs et larves d'Arbacea, mais qui, d'après les travaux de Naegeli sur les algues spirogyres, de F. S. Locke, S. Ringer et Phaer sur les têtards et les annélides d'eau douce, serait

imputable à l'action olygodynamique de traces infinitésimales de cuivre.

Dans une série d'expériences analogues à celles précédemment décrites, effectuées cette fois-ci avec de l'eau soigneusement redistillée, S. Ledebt n'a pu observer aucune action nocive de la part de celle-ci, mais elle a pu constater que l'eau redistillée devient toxique si on la laisse séjourner dans des récipients en cuivre. L'eau distillée par contre perd sa nocivité si on l'additionne de poudres inertes : charbon, graphite ou colloïdes, ou si on l'abandonne dans des vases en platine ou en verre, les substances nocives se déposant sur les parois. Enfin l'addition d'une quantité suffisante d'eau de conduite à l'eau distillée supprime sa nocivité, les matières organiques fixant ainsi le cuivre ; conclusion qui semble venir confirmer l'hypothèse attribuant au cuivre la toxicité de l'eau distillée. Pour ses recherches ultérieures, S. Ledebt a utilisé de l'eau redistillée dans des ballons de verre d'Iéna.

Cependant, ces données qui montrent que l'eau soigneusement redistillée convient à certains organismes, ne sont valables que s'il s'agit d'êtres qui, au point de de vue osmotique, sont, dans une large mesure tout au moins, indépendants du milieu extérieur. Sans parler des animaux marins qui, habitués à la salinité, ne peuvent vivre dans l'eau distillée, il est un bon nombre d'organismes d'eau douce qui sont incapables de vivre dans un milieu totalement privés de sels. D'après G. Bullot, de l'eau, distillée plusieurs fois avec le plus grand soin est toxique pour *Gammarus* d'eau douce, que la distillation ait lieu dans des récipients en verre d'Iéna, en platine ou en quartz. Si, au contraire, on ajoute une trace de chlorure de sodium ($N \times 10^{-5}$) les *Gammarus* survivent aussi longtemps que dans l'eau douce.

S. Ledebt conclut avec Loeb que, dans ce cas, la petite quantité de sel ajoutée au milieu extérieur suffit à maintenir l'imperméabilité de la membrane vis-à-vis de l'eau, et à empêcher sa pénétration en trop grande quantité dans les humeurs.

Il résulte des expériences de Loeb que c'est bien moins les variations de tension osmotique elles-mêmes que les variations de composition du milieu extérieur qui sont dangereuses pour l'animal aquatique. Les animaux d'eau douce habitués déjà à vivre dans des milieux très faiblement minéralisés s'accommodent aisément, pour la plupart, de milieux moins riches en sels.

L'opinion de Loeb est que la nature même des sels qui constituent le milieu, et les rapports qu'ils affectent les uns avec les autres, jouent un rôle beaucoup plus important que la pression osmotique elle-même.

D'après W. Ostwald, la toxicité devrait être rapportée, non à la variation de tension osmotique, mais à des modifications de perméabilité des membranes, modifications auxquelles serait lié un trouble profond dans les échanges avec le milieu extérieur.

Dans une autre série d'essais enfin, S. Ledebt obtient des résultats analogues à ceux de Ch. Richet concernant l'action d'un certain nombre de chlorure de métaux alcalins et alcalino-terreux sur les poissons. Ceux-ci sont, en général, bien supportés, sauf les chlorures de potassium et de baryum.

Dans la série des travaux qui ont utilisé les poissons comme animaux d'expérience, nous devons citer ceux des auteurs américains P. S. Pittenger et Ch. E. Vanderkleed [95] qui, dans le but de fournir aux pharmaciens et aux médecins une méthode pratique et simple de dosage biologique, ont, en 1915, préconisé l'emploi de *Carassuis aureatus* (cyprin doré) pour l'étude des composés digitaliques.

Ces auteurs ont décrit avec beaucoup de précision leur technique et les conditions de leurs expériences : nature de l'eau, forme des récipients, volume des solutions. Ils ont déterminé les limites de sensibilité des animaux, les dilutions et la température optima pour un « essai standard ».

De tous ces essais ils ont conclu que l'emploi de ces animaux se justifie pleinement : en effet, les poissons sont

sensibles à des variations de la concentration des solutions de l'ordre de 2,5 pour 100; l'absorption du toxique semble se faire d'une manière constante chez tous les animaux, les variations individuelles de sensibilité étant bien moins accusées que pour les grenouilles ou les cobayes ; enfin, la sensibilité du test, c'est-à-dire la différence dans les temps de survie augmente quand la concentration décroit.

En outre, on peut ne pas tenir compte du poids de l'animal, les expériences ayant montré que les résultats sont les mêmes avec des poissons pesant dix fois plus que d'autres.

Par contre, la température a une influence considérable sur les temps de survie, et il est nécessaire de la maintenir constante pendant toute la durée des essais, constatation confirmée plus tard par P. Pittenger (1919) [94], à la suite de nouvelles expériences. Ce dernier auteur a observé, une fois encore, que l'augmentation de température fait croître la toxicité de la drogue. Ajoutant aux indications précédemment données avec Ch. E. Vanderkleed, il a préconisé de maintenir la température constante, non plus seulement pendant la durée des expériences, mais au moins une heure avant d'entreprendre les essais, en utilisant pour cela un appareil à régulateur électrique.

Poursuivant des recherches similaires sur les produits digitaliques W.-J. Mc. Gill [54] a utilisé, lui aussi, l'année suivante, la technique décrite par P. Pittenger et Ch. E. Vanderkleed, et a obtenu des résultats analogues.

Citons encore les travaux de M. Goldsmith [55] qui, à la même époque, a précisé quelques conditions permettant de réduire au minimum les causes d'erreur dans les expériences utilisant les poissons : ceux-ci doivent être placés dans un milieu qui ne doit pas beaucoup différer du milieu naturel ; les dimensions des aquariums doivent être suffisamment grandes, et les poissons ne doivent pas y séjourner trop longtemps, bien qu'une « acclimatation » de quelques jours soit nécessaire.

Comme l'avaient fait précédemment Ch. Richet et M. Cololian, et comme le feront plus tard Sommery et

Tchang Si, [144], P. Portier et F. Gueylard ont étudié, en 1917, [57-59-60-61], puis en 1922 avec M. Duval [97-98-99-100], l'influence de la salinité du milieu sur la physiologie des poissons, leur résistance et leur adaptation à des changements brusques de concentration en sels.

Leurs résultats sont analogues à ceux trouvés par leurs prédécesseurs. Ils ont en effet pu constater que les épinoches, poissons d'eau douce, s'adaptent facilement à des variations de salinité ; les chiffres trouvés sont même encore plus frappants : ces poissons arrivant à supporter pendant quelques heures des solutions à 50 g. 0/00 de chlorure de sodium, et durant quelques jours des solutions à 45 g. 0/00. Le poids de l'animal décroît d'abord, puis augmente, phénomène qui serait dû à l'osmose : l'eau d'abord rejetée pénétrerait à nouveau, une fois l'équilibre établi.

Des mesures faites sur des carpes et des tanches ont montré que la pression osmotique du sang de l'animal augmente à mesure que le milieu s'enrichit en sels, mais moins vite que celle du milieu extérieur. Il semble qu'à partir d'une certaine concentration maxima, la branchie soit forcée, car le poisson présente des troubles qui le conduisent rapidement à la mort.

Quelques années plus tard, Ch. Richet reprendra avec Oxner [131] des expériences relatives à l'accoutumance des animaux marins aux eaux sursaturées. Leurs conclusions analogues à celles des recherches antérieures confirment que ces animaux supportent des salinités dépassant de 37 pour 100 la salinité normale, mais que par contre, une diminution de 18 pour 100 entraîne leur mort.

L'étude détaillée de la perméabilité des branchies au chlorure de sodium sera entreprise en 1937 par Ancel Kerp. [67].

Confirmant les faits observés par S. Ledebt, F. Gueylard et M. Duval [58] ont constaté, eux aussi, que l'eau distillée préparée dans des récipients en cuivre était toxique pour les poissons, et ont préconisé l'emploi d'eau distillée préparée dans des récipients en verre.

Ils ont en outre signalé que la résistance des poissons diminue à l'époque du frai, quand la température augmente, et ont précisé l'époque de leurs essais, soit octobre à mars.

Nous avons vu que Ch. Richet, d'une part, P. Pittenger et Ch. E. Vanderkleed d'autre part, avaient signalé l'influence considérable de la température sur l'activité des drogues vis-à-vis des animaux marins.

Des résultats analogues ont été obtenus par Unger [155], en 1918, dans une étude de l'action du chloral sur les poissons. Une solution N/100 de chloral, qui reste sans effet de 16° à 23°, devient anesthésique vers 28°-29°. Inversement, en abaissant la température, les animaux récupèrent leur activité. Cependant, Unger a pu constater une réapparition de l'action anesthésique vers 15° et une narcose profonde vers 6°.

En 1917, l'auteur américain Ed. B. Powers [102] a publié les résultats d'un travail très détaillé sur l'emploi du poisson doré (*Carassius carassuis*) comme animal test pour l'étude de la toxicité. Le but de ses recherches avait été de vérifier la valeur de la méthode de P. Pittenger et Ch. E. Vanderkleed, et d'y apporter, si nécessaire, des modifications pratiques.

S'étant assuré, dans une série d'essais préliminaires, que la réaction des animaux est constante vis-à-vis des drogues à essayer, que l'apparition des phénomènes observés présente un caractère régulier, et enfin que les poissons sont sensibles à de faibles variations de concentration de ces drogues, conditions indispensables pour que cette méthode d'essai soit utilisable, il a entrepris l'étude d'un grand nombre de produits toxiques.

Comme P. Pittenger et Ch. E. Vanderkleed, Ed. B. Powers a mis en évidence l'influence considérable des variations de température sur l'activité de ces toxiques, et il s'est assuré, pour tous ses essais, de la constance de la température, la régulation thermique de l'aquarium dans lequel sont placés les récipients étant obtenue par addition d'eau chaude à l'eau courante. Les diverses concentra-

tions adoptées sont celles qui provoquent la mort en des temps compris entre 45 minutes et 210 minutes, limites au-delà desquelles l'essai perd sa sensibilité et sa précision.

Dans ces conditions, Powers a, lui aussi, constaté la toxicité de l'eau distillée pour les poissons, et l'a attribuée au cuivre, étant données d'une part l'analogie entre l'action de l'eau distillée et celle de solutions très diluées de chlorure de cuivre, et d'autre part la disparition de cette action toxique par ébullition prolongée, le cuivre se trouvant à l'état colloïdal.

Pour tous les toxiques étudiés : chlorures et nitrates de métaux alcalins, alcalino-terreux, et de métaux lourds (cuivre, fer et cadmium) ; acide chlorhydrique et cyanure de potassium ; alcools butylique et isobutylique ; phénol ; caféine et pyridine, les temps de survie des poissons n'augmentent pas d'une manière inversement proportionnelle à la concentration ; aux plus fortes concentrations, l'augmentation des temps de survie est moins rapide que la diminution de concentration des solutions.

D'autre part, les toxicités du cyanure de potassium, du chlorure de potassium et des alcools n'étant pas proportionnelles à la concentration moléculaire, Ed. B. Powers a admis qu'il est fort peu probable qu'elles soient dues à la modification de pression osmotique.

Il a alors, le premier, traduit ses résultats par des courbes, en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée les temps de survie des animaux. Ces courbes dites « de temps de survie » sont représentées par des hyperboles pour presque tous les toxiques étudiés (exception faite pour le chlorure de cuivre, le chlorure de cadmium et le chlorure ferrique).

Dans le but de faire une étude comparative des différents toxiques, Ed. B. Powers a cherché à déterminer un « critère standard » qui puisse servir de base de comparaison.

Il a ainsi construit les courbes inverses des hyperboles ; en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée

la réciproque des temps de survie, c'est-à-dire 1/t (multiplié par 100 pour éviter les fractions).

Ces courbes montent lentement aux faibles concentrations, plus vite ensuite, puis de nouveau lentement aux fortes concentrations. La partie médiane de ces courbes dites de « velocity of fatality » (rapidité de mort) est une ligne droite.

En considérant les points d'intersection de ces droites avec l'axe des x, points représentant la concentration minima toxique « a » ou « seuil théorique de toxicité », Ed. B. Powers a, sous forme d'une expression mathématique, re-représenté la valeur toxique par le rapport entre la racine carrée de la tangente de la pente des droites à la concentration minima de toxique qui tue les poissons :

$$T = \frac{\sqrt{\text{tg } \theta}}{a}$$

Cette formule par laquelle Ed. B. Powers a, pour la première fois, cherché à définir la toxicité sera, nous le verrons, reprise par d'autres auteurs ; nous aurons l'occasion, au cours de ce travail, d'étudier plus en détail ce mode de représentation, d'en chercher les avantages, et au besoin, de l'utiliser pour nos essais personnels.

En France, à la même époque, E. Bachrach [5] a repris l'étude de Ch. Richet sur les conditions de milieu compatibles avec la vie des poissons, et a précisé plus particulièrement les facteurs qui conditionnent l'intoxication par certains sels minéraux. Elle a constaté, au cours de recherches sur l'action du chlorure de cobalt et de l'arséniate de potassium sur ces animaux, que leur résistance dépend pour une grande part du rapport du volume de la solution à la surface libre, quand on emploie des vases étroits ou larges, contenant toujours une même quantité de liquide. La durée de survie est d'autant plus grande que ce rapport est plus élevé. Avec des vases cylindriques ou prismatiques la valeur de la dose toxique est donc liée à la hauteur de l'eau dans le récipient. L'influence très nettement favorable qu'exerce

pour la survie des poissons, en milieu toxique, la réduction de la surface libre, a, bien entendu des limites. Pour des surfaces libres très petites par rapport au volume du liquide (par exemple : V/S = 300), les poissons périssent en moins de 24 heures par asphyxie, conformément aux expériences de Ch. Richet.

En outre, E. Bachrach a signalé que la forme des récipients constitue un second facteur dont l'influence, dans l'intoxication, est indéniable. La durée de survie est moins grande dans les ballons cylindriques que dans les bocaux à section rectangulaire ou carrée. Dans le premier cas, les poissons se déplacent plus que dans le second où ils trouvent des angles pour se réfugier et s'immobiliser.

L'année suivante, l'auteur allemand H. Fuhner [49-50] a eu l'idée d'utiliser des poissons comme animal réactif pour l'étude comparative de narcotiques, en particulier des homologues supérieurs à chaîne normale et à chaîne ramifiée de l'alcool ordinaire.

Tous les poissons n'étant pas également sensibles aux conditions de vie qu'on leur impose dans les expériences, il a tout d'abord cherché quelle espèce conviendrait le mieux pour ses essais. Les gardons, en effet, peuvent être conservés plus d'un jour dans un récipient en fer contenant trois litres d'eau par animal, sans être asphyxiés, alors que les perches sont par contre très sensibles aux essais de longue durée dans une petite quantité d'eau. H. Fuhner a lui-même constaté que les poissons rouges dorés et les truites se prêtent mal aux essais de narcotiques, en raison de leur très grand besoin en oxygène. Il recommande par contre de petits vairons (*Phoxinus laevis*) avec lesquels on peut effectuer des essais dans des récipients contenant 1/4 de litre d'eau. Il a constaté, en outre, qu'il est important que les animaux aient été capturés récemment, et qu'ils aient été conservés dans un aquarium à eau courante fraîche, la sensibilité vis-à-vis des narcotiques diminuant après une longue conservation dans une eau mal aérée.

En opérant toujours avec des animaux témoins, traités comme les animaux d'essai mais sans narcotique, et en veil-

lant à maintenir la température constante, en raison de l'influence des variations de température sur l'action narcotique, l'auteur a cherché à établir une échelle d'activité des différents produits essayés, en prenant pour terme de comparaison la « concentration limite narcotique », moyenne entre la concentration minima qui produit la narcose en une demi-heure et la concentration maxima qui ne produit aucun effet en plusieurs heures.

Nous devons à P. Portier [96] et à J. Lopez-Lomba [101] une intéressante série de recherches sur l'utilisation des poissons comme animal réactif pour l'étude des alcaloïdes et des glucosides.

La raison qui a motivé pour ces auteurs le choix d'un tel réactif biologique est la constitution particulière du système circulatoire du poisson. C'est un fait classique, établi par Claude Bernard, que la « voie d'introduction » des poisons a une grande influence sur l'intensité de leur action. H. Roger [132-133-134-135-136] a renouvelé et confirmé cette doctrine en montrant que le foie et le poumon possèdent un pouvoir d'arrêt et de transformation pour un grand nombre de poisons. Or, comme nous l'avons déjà dit, les poissons offrent des dispositions anatomiques très favorables à l'afflux de la substance toxique, d'emblée, dans les capillaires artériels « champ d'action des poisons ».

Le but des expériences de P. Portier et J. Lopez-Lomba a été de déterminer les facteurs physiques, chimiques et biologiques qui exaltent au maximum l'absorption du poisons par les branchies.

Ils ont pensé, *à priori*, que trois facteurs doivent être importants :

1°) la tension superficielle dont l'abaissement doit faciliter la pénétration des substances ;

2°) la réaction du milieu : la mucine de la branchie étant précipitée par les solutions acides et au contraire soluble dans les solutions alcalines, l'alcalinité doit faciliter l'absorption ;

3°) la température, qui doit intervenir dans l'exaltation ou le ralentissement des phénomènes biologiques de ces poïkilothermes.

Avant de vérifier, par des expériences personnelles, ces hypothèses, J. Lopez-Lomba [84-85-86] a fait quelques remarques concernant certaines conditions expérimentales, en particulier l'influence de l'espèce et de la taille des animaux.

Quelques essais préliminaires lui ont permis de montrer que la sensibilité de poissons d'espèces différentes, vis-à-vis des substances toxiques, varie dans des limites assez larges. Par exemple : dans une solution de strychnine à 1 100.000, chaque animal se trouvant dans une quantité de solution proportionnelle à son poids, une anguille meurt en 44 minutes, une épinoche en 52 minutes, un vairon en 86 minutes, et un poisson rouge en 3 heures et demie.

Lopez-Lomba a alors préconisé l'emploi de l'épinoche, et, après quelques essais, a insisté sur la nécessité d'opérer sur des animaux de tailles et de poids aussi identiques que possible, en raison de la grande influence de ces facteurs sur la sensibilité aux toxiques. Il a enfin signalé qu'il était préférable de choisir des poissons de même sexe.

Ayant défini ces conditions expérimentales, J. Lopez-Lomba a vérifié, avec P. Portier, l'influence de la réaction, de la température et de la tension superficielle sur l'activité des toxiques pour les poissons.

1°) **Réaction** : pour amener les solutions à une réaction donnée, les auteurs ont utilisé l'acide acétique ou le carbonate disodique à 10 %. Les résultats ont été les suivants :

Acidification : dans deux ballons contenant, l'un 25 cc. d'eau ordinaire, l'autre 25 cc. d'eau distillée, on ajoute 1 goutte d'acide acétique à 10 %. Dans l'eau ordinaire on observe la mort du poisson en 21 heures, alors qu'on l'obtient en 56 minutes dans l'eau distillée. Par addition de 11 gouttes d'acide acétique : dans l'eau ordinaire le

poisson est encore vivant au bout de 3 heures et demie, alors que dans l'eau distillée la mort survient en 42 minutes.

Alcalinisation : l'addition de II gouttes de carbonate disodique à 10 % provoque la mort en 23 minutes dans l'eau distillée, et en 21 heures dans l'eau ordinaire. L'addition de IV gouttes la provoque en 46 minutes dans l'eau distillée et en 3 heures et demie dans l'eau ordinaire.

L'examen de ces résultats a permis aux auteurs de conclure que « pour un même degré d'acidification ou d'alcalinisation », les poissons résistent moins bien en eau distillée qu'en eau ordinaire ; « ce qui doit s'expliquer par le degré d'ionisation des solutions employées. »

Il est bien évident que dans ces essais, les auteurs ont envisagé « un même degré d'acidification ou d'alcalinisation » en poids d'acide ou de base ; cependant les concentrations en ions hydrogènes restent bien différentes, l'eau distillée de pH déjà plus acide que l'eau ordinaire ne contenant pas de corps tampons, alors que celle-ci en renferme des quantités appréciables. Ces auteurs ont d'ailleurs signalé que l'addition de I goutte de CO_3Na_2 à 10 0/0 amène la réaction de 25 cm^3 d'eau distillée du pH 5,8 au pH 10,3, alors que le pH d'une même quantité d'eau ordinaire ne varie que de 7,7 à 9,4, et que « lorsqu'on ramène deux solutions de concentrations identiques à un même pH dans l'eau ordinaire et dans l'eau distillée, le pH de l'eau distillée ne se maintient pas, alors qu'il se maintient dans l'eau ordinaire. »

Cette instabilité de la réaction de l'eau distillée à incité P. Portier et J. Lopez-Lomba a utiliser pour leurs essais l'eau de conduite dont la réaction est plus stable, l'eau distillée possédant en outre une certaine toxicité propre, en raison de la présence de sels de cuivre. Ils ont d'autre part signalé que l'eau ordinaire est préférable, dans le but toxicologique cherché, la toxicité des alcaloïdes dissous dans l'eau ordinaire étant plus grande.

Les auteurs ont alors précisé l'influence de l'alcalinité qui favorise l'absorption des toxiques pour les poissons, et de

l'acidité qui est, par contre, nettement défavorable. Leurs recherches leur ont en effet montré que le maximum de toxicité est obtenu avec les solutions alcalines, ce qui confirmerait la plus grande activité des poisons dans l'eau ordinaire que dans l'eau distillée.

Cependant, afin d'éviter la toxicité propre des acides ou des bases, les auteurs ont effectué leurs expériences dans une zone de pH comprise entre pH 4,5 et pH 9,5 qui sont les pH extrêmes compatibles avec la vie des poissons utilisés.

2°) **Tension superficielle :** P. Portier et J. Lopez-Lomba ont montré ensuite que l'addition aux solutions de divers agents chimiques tels que sels biliaires, peptone, etc..., abaisse leur tension superficielle, modifie les échanges osmotiques, et facilite la pénétration des toxiques à travers l'épithélium branchial.

3°) **Température :** une série d'expériences, enfin, a permis aux auteurs de démontrer qu'une différence de trois degrés peut faire varier la toxicité d'un alcaloïde du simple au double ; d'où la nécessité de maintenir la température constante, ce qu'ils ont réalisé grâce à un système thermostatique avec régulateur au xylol.

Comme E. Bachrach, P. Portier et J. Lopez-Lomba ont enfin conclu que les expériences doivent être effectuées dans des récipients de mêmes formes, et contenant toujours la même quantité de solution. Pour leur part, ils ont trouvé avantageux d'utiliser des ballons d'une contenance de 80 cc. dans lesquels ils ont placé un poisson, dans 25 cc. de solution.

Les auteurs ont alors cherché à adapter leur technique à des fins toxicologiques, à savoir : déceler de très petites quantités de poisons, alcaloïdes et glucosides. Les essais concernant le chlorhydrate de cocaïne ont particulièrement attiré notre attention ; la description des phénomènes d'intoxication chez les poissons y est relaté avec précision : « Tout d'abord la pigmentation de la peau disparaît presque

totalement, en quelques instants. Le dos devient jaune verdâtre très clair. Chez les femelles, seules restent colorées, et plus qu'à l'état normal, deux taches vertes, juste au-dessus des yeux ; chez elles, les iris se décolorent sensiblement ; chez les mâles, les iris seuls deviennent plus colorés que chez les témoins, et se détachent du reste du corps devenu très clair. Le ventre est très argenté. La respiration est lente dès le début. De temps en temps, le poisson redresse ses épines assez lentement. Dans les solutions à 1 /300.000, le poisson se met en peu de temps sur le flanc, et souvent il a des mouvements de rotation autour de l'axe longitudinal du corps, on croit qu'il va mourir ; mais au bout d'un certain temps, si la solution n'est pas trop concentrée, ces troubles disparaissent et l'animal survit parfois dix-huit heures après cette période. Ses épines sont collées, la bouche est fermée, même une heure après la mort. Les opercules ne sont pas écartés ».

Plusieurs années plus tard, en 1939, P. Duquénois [46], pour une étude de la physiologie de la résine de chanvre indien, adoptera très exactement la technique préconisée par P. Portier et J. Lopez-Lomba, et vérifiera l'influence des divers facteurs sur la toxicité de cette drogue pour les épinoches. Ses résultats viendront en tous points confirmer ceux de ces précédents auteurs.

A la même époque, F. Gueylard et M. Duval (1922) [58], après avoir consacré de nombreuses recherches à l'étude de l'influence des variations de la salinité sur la physiologie des poissons, ont poursuivi leurs travaux par des expériences sur l'action toxique de divers acides : acide acétique, acide propionique, acide lactique, acide phosphorique, sur des poissons d'eau douce, les épinoches.

Les expériences ont été effectuées avec de l'eau distillée dans des appareils en verre. Afin d'éviter les variations de pH au cours des essais, les solutions ont été « tamponnées » par une quantité suffisante du sel de sodium de l'acide étudié, sel reconnu d'autre part inoffensif pour le poisson ; cette précaution est indispensable, les poissons placés dans de l'eau

distillée légèrement acidifiée y rétablissant spontanément et très rapidement une réaction voisine de la neutralité.

L'examen des résultats montre que la durée de survie est très différente, pour un même acide, suivant le pH (mesuré par la méthode colorimétrique). Elle croît lentement d'abord, puis très rapidement quand la concentration en ions hydrogène diminue. Mais la toxicité observée n'est pas imputable à la seule concentration en ions hydrogène ; en effet, une concentration qui permet la vie pendant plusieurs heures, lorsqu'elle est due à l'acide phosphorique entraîne la mort en quelques minutes si elle est obtenue par l'acide acétique. La nature de l'acide intervient donc dans une grande mesure dans la toxicité, pour les épinoches, des solutions acidifiées.

En 1924, M. Tiffeneau a, avec plusieurs collaborateurs, H. Dorlencourt, Sommaire, Dogny et C. Torres, [149-150-154] entrepris un certain nombre de recherches concernant les modifications apportées à l'activité d'une série d'hypnotiques par la substitution de divers radicaux dans leur formule, et les rapports entre la solubilité et les propriétés physiologiques de ces hypnotiques. En raison de la faible solubilité de ces produits, ces auteurs ont été conduits à utiliser les poissons comme réactif biologique.

Le choix de leur « test de réaction » apporte un élément nouveau : ils ont en effet fixé comme terme des expériences « l'immobilité complète (c'est-à-dire persistant après excitation mécanique) des nageoires caudale et dorsale (la respiration et les réflexes étant conservés) ».

Cette technique a de nouveau été utilisée par P. Nicolle [92] pour une étude pharmacodynamique de glycols doués de propriétés hypnotiques.

Tous ces auteurs ont constaté que l'emploi des poissons se justifiait pleinement pour les expériences sur les substances hypnotiques.

Nous verrons que M. Tiffeneau utilisera la même méthode, avec J. Lévy, D. Broun et R. Cahen [145-146-147-

151-152-153] pour des recherches sur les facteurs conditionnant l'action des hypnotiques barbituriques.

A la même époque, des auteurs allemands ont mis en évidence l'avantage de l'emploi des poissons pour l'essai des drogues anthelminthiques. R. Wasicky [80-160-161] et J. Becker ont en effet consacré leurs travaux à la mise au point d'une technique pratique. Ils ont particulièrement insisté sur le fait que l'espèce et la taille des animaux mis en expérience n'ont aucune influence sur l'activité de la fougère mâle. Pour des concentrations identiques, les temps de survie sont en effet semblables, quelle que soit l'espèce envisagée : *Gobius*, *Carassius* ou *Phoxinus*, et quelle que soit la taille des animaux, (2 à 12 cm).

Ces mêmes auteurs ont utilisé à nouveau cette technique pour l'essai de l'essence de chenopodium, et E. Knaff Lenz et A. Hoffmann [69-70] l'ont, eux aussi, adoptée pour l'étude de diverses drogues anthelminthiques.

C'est en 1926, une quarantaine d'années après P. Regnard que, plusieurs auteurs américains, R. Adams, E. K. Rideal, W.-B. Burnett, R. L. Jentins et E. E. Dreger [1] ont, pour la seconde fois, utilisé les poissons pour l'étude comparative de l'activité de divers anesthésiques locaux. D'après ces auteurs, les diverses recherches employant d'autres réactifs biologiques avaient eu, jusque là, un caractère qualitatif. P. Pittenger et Ch. Vanderkleed ayant pu utiliser les poissons pour une étude quantitative des produits digitaliques, Ed. B. Powers les ayant choisi pour comparer les toxicités de produits organiques et inorganiques, et Shelford ayant eu recours à des essais analogues pour déterminer le degré de pollution des eaux, R. Adams et ses collaborateurs ont cherché à adapter cette technique à l'essai comparatif de paraaminobenzoates d'alcoyls.

Les solutions anesthésiques ont été effectuées dans de l'eau redistillée deux fois dans des appareils de verre Pyrex, et en solution alcaline de permanganate de potassium, afin d'éliminer la toxicité due au cuivre et au plomb. Les poissons ont été maintenus à la température de 20°, dans les

aquariums, et durant les essais, température contrôlée par un thermostat, plusieurs heures avant et pendant les expériences.

Placés dans une solution anesthésique, les poissons présentent des troubles identiques à ceux décrits par P. Regnard : ils finissent par devenir complètement immobiles ; la sensibilité à une pression des nageoires ou de la queue est alors absolument nulle, et le poisson ne réagit pas. Les temps nécessaires pour obtenir la disparition de la sensibilité ont été considérés par les auteurs comme « temps anesthésiques ». Remis dans l'eau pure, les poissons se rétablissent presque toujours.

Ayant opéré sur plusieurs centaines de poissons, à diverses concentrations, les résultats n'ont pas permis aux auteurs de déceler une différence de sensibilité corrélative du poids et de la taille des animaux. La concentration la plus forte d'anesthésique donne une anesthésie extrêmement rapide, alors que les doses très faibles peuvent donner une anesthésie incertaine ou incomplète. Les auteurs ont par conséquent choisi en général, des concentrations provoquant l'anesthésie en des temps limites compris entre 5 minutes et 40 minutes.

Comme Ed. B. Powers, les auteurs américains ont exprimé leurs résultats par des courbes tracées en portant en abscisse les concentrations moléculaires, et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie. Ces courbes sont représentées par des hyperboles limitées. En construisant les courbes inverses (concentration moléculaire en abscisse, réciproque des temps d'anesthésie : 1/t, multipliée par 100, en ordonnée), on obtient des lignes droites dans certaines limites, déviées à la partie supérieure et à la partie inférieure. Ces droites permettent une facile comparaison entre les différents anesthésiques étudiés.

R. Adams et ses collaborateurs ont en outre cherché à déterminer les temps de guérison, c'est-à-dire les temps nécessaires à chaque poisson pour revenir à l'état normal, après complète anesthésie et introduction immédiate dans

l'eau distillée. Les chiffres obtenus ne sont pas réguliers, et on observe des variations considérables pour des poissons mis dans la même solution, variations que les auteurs ont pensé pouvoir attribuer à la persistance des anesthésiques dans les branchies.

Enfin, en prolongeant le séjour des poissons dans les solutions pendant des temps variables mais supérieurs aux « temps anesthésiques », avant de les replacer dans l'eau pure, ces auteurs avaient pensé pouvoir déterminer le temps limite supérieur de séjour dans la solution toxique permettant la guérison de l'animal, et obtenir ainsi une idée grossière des toxicités relatives. Malheureusement, ils ont été obligés de constater qu'il intervient dans ce cas beaucoup d'autres facteurs qui troublent les résultats, et ils n'ont pas poursuivi leurs expériences.

Des essais similaires ont enfin été repris, l'année suivante, par R. Adams, H. Heckel [63] et O. A. Barnes [3].

A la même époque, H. A. Mc Guigan [62], dans une étude générale des différentes méthodes susceptibles d'être utilisées pour des essais comparatifs d'anesthésiques locaux, a mis en évidence les avantages de la technique de R. Adams et de ses collaborateurs, et a préconisé, pour évaluer le pouvoir anesthésique d'une drogue, la formule utilisée par Ed. B. Powers pour définir la toxicité, c'est-à-dire le rapport entre la racine carrée de la tangente de la pente des courbes inverses d'anesthésie et la concentration minima de drogue qui provoque cette anesthésie « a ».

$$A \text{ (valeur anesthésique)} = \frac{\sqrt{\operatorname{tg} \beta}}{a \text{ (seuil théorique d'anesthésie)}}.$$

Parmi les recherches ayant utilisé les poissons comme réactif, nous citerons, en 1927, celles de Hakan Rydin [137], concernant l'action renforçatrice de l'effet narcotique de la cocaïne par le pyrogallol sur *Gobius flavescens*, et celles de Boyer [29] consacrées à l'étude de quelques arsénobenzènes.

L'auteur italien G. Carbonaro [32] a fait une étude comparative des activités de la cocaïne lévogyre, et d'un stéréoisomère, la pseudococaïne dextrogyre (psicaïne).

D'après ses conclusions, les phénomènes d' « anesthésie générale » provoqués par la psicaïne sont identiques à ceux dus à la cocaïne : en effet, chez des poissons immergés dans les solutions anesthésiques, on observe, tout d'abord, des mouvements brusques, puis une légère torpeur qui augmente peu à peu. L'animal s'immobilise au fond du récipient jusqu'à ce qu'il tombe sur le flanc, et reste comme mort. Laissé une heure dans la solution, puis lavé et remis dans l'eau pure, il ne tarde pas à revenir à l'état normal. Toutefois si, dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 g. 0/00, l'animal git, immobile au fond du récipient au bout de 5 minutes, on ne peut observer aucun trouble apparent dans une solution de psicaïne, à la même concentration. Ces résultats ont permis à G. Carbonaro de conclure d'une manière certaine à la plus grande activité de la cocaïne.

Notons encore un travail de J. Lévy et R. Hamet [82] dans lequel ces auteurs ont, eux aussi, mis en évidence l'action favorisante de la réaction alcaline des solutions sur le pouvoir toxique d'un poison, la télépathine, alcaloïde du Yagé, et par là même la plus grande activité de ce poison dans l'eau ordinaire que dans l'eau distillée.

La même année, l'auteur allemand L. Lendle [75-76] a, lui aussi, préconisé l'utilisation de petits poissons (silberhorfen) pour l'essai de substances narcotiques : paraldéhyde, hydrate d'amylène, isopral, sulfonal, éther, etc...

Ayant effectué des solutions de ces substances narcotiques dans de l'eau de conduite bien aérée, à des concentrations provoquant des phénomènes de narcose en une heure à la température de 15° à 19°, cet auteur a choisi un terme de réaction un peu particulier. Lorsque un poisson, immobile, en apparence de mort, est retiré de la solution avec un petit filet, et replongé immédiatement dans la même solution, on peut observer quelques mouvements de nage réflexes. L'apparition de ces mouvements est ce que

L. Lendle appelle « la réaction du filet positive ». Cependant, à un certain degré de narcose, ces mouvements n'apparaissent plus, la « réaction du filet » est alors « négative ». C'est ce degré de narcose que l'auteur a choisi comme test de la réaction. Il a en outre précisé, comme l'avaient fait F. Gueylard et M. Duval, l'époque de ses essais, soit octobre à février.

A la même époque, en Angleterre, K. E. Carpenter [33] a entrepris une étude détaillée de l'action toxique des sels de plomb sur les poissons.

Après avoir successivement envisagé l'influence du sexe, de l'espèce, de la nature de l'eau, de la taille et du poids des animaux, de la réaction et de la température des solutions, de la saison, elle résume ainsi ses conclusions : la toxicité des sels de plomb est fonction de la concentration ; elle est inversement proportionnelle à la taille et au poids des animaux, et en relation directe avec la température ; elle suit donc la règle de Van't Hoff.

D'après K. E. Carpenter, on pourrait, contrairement aux constatations antérieures, ne pas tenir compte de la toxicité propre de l'eau distillée, des poissons y ayant survécu cinq semaines et plus. D'autre part, la toxicité de certains sels de plomb se trouve modifiée du fait de la libération d'ions H provenant de leur hydrolyse. Des essais entrepris avec de l'acide nitrique ont en effet montré que des poissons sont tués en sept heures, à pH 4,4, en 27 heures à pH 5,0 et que des pH supérieurs à 5,4 ne sont pas mortels.

Le terme de la réaction choisi est la mort qui, d'après l'auteur, est un point facile à noter, car elle est précédée 10 à 15 minutes auparavant, de violents sursauts suivis d'une phase convulsive secouant tout le corps 2 ou 3 minutes avant que le poisson ne tombe sur le flanc.

K. E. Carpentier a, comme Ed. B. Powers, établi des courbes de survie en fonction de la concentration, mais l'action observée ne correspond pas au même type de toxicité. Une étude un peu approfondie lui a, en effet, permis d'admettre que le plomb n'est pas véritablement toxique

par lui-même, mais qu'il provoque une sorte d'asphyxie en se combinant avec le mucus et en formant un voile sur les branchies.

Des résultats analogues ont été trouvés en Allemagne par Behrend Behrens [27] qui a, lui aussi, conclu à l'asphyxie des animaux par formation d'une pellicule résultant de la combinaison du plomb avec les protéines.

Dans un travail publié quelques années plus tard, consacré à l'étude de la toxicité de sels de différents métaux pour les poissons, H. Steidle et H. Durr [142] n'ont, par contre, pu mettre en évidence aucune action nocive du nitrate de samarium.

Citons enfin un travail publié la même année, par E. Bachrach [4] relatant quelques essais sur l'action combinée de la strychnine et de la morphine sur le système nerveux des poissons.

Nous avons vu que, à la suite de ses travaux sur un certain nombre d'hypnotiques, M. Tiffeneau avait pu considérer que la technique utilisant les poissons comme réactif convenait parfaitement à l'étude de ces drogues. C'est pourquoi avec J. Lévy, D. Broun et R. Cahen [145-146-147-148-151-152-153], il eut recours à nouveau à cette méthode pour des recherches sur plusieurs autres hypnotiques.

Dans les expériences de J. Lévy, [77-78], les animaux, d'un poids moyen de 10 à 14 g., sont introduits dans 200 cc. des solutions hypnotiques effectuées dans l'eau de mer, de pH constant, à la température de 23° à 24°, et contenues dans des vases de pile Leclanché, la hauteur du liquide atteignant 3 à 4 cm. Après un certain temps T 1, les poissons se mettent sur le côté, se renversent sur le dos et restent immobiles. Les animaux sortis de la solution sont alors introduits dans de l'eau de mer où ils restent sur le dos un temps T2, qui constitue la seconde phase de l'expérience. Cette méthode permet de se rendre compte d'une part, de l'activité du produit, d'autre part de la durée de son action.

Au cours de ses essais, J. Lévy a pu observer des différences notables de réaction suivant l'espèce de poisson utilisée : c'est ainsi que les serrans (perches de mer) sont plus sensibles que les *Gobius paganellus*, eux-mêmes plus sensibles que les *Gobius lota* à l'action des différents glycols.

Utilisant à nouveau cette méthode pour l'étude de quelques hypnotiques de la série barbiturique, J. Lévy et R. Cahen [81] ont pu mettre en évidence des phénomènes d'accoutumance rapide des poissons aux hypnotiques mis en œuvre, et D. Broun [31] a déterminé l'influence de divers facteurs sur l'action narcotique des acides alcoyl-barbituriques.

Poursuivant leurs recherches sur les hypnotiques, M. Tiffeneau, J. Lévy et D. Broun [151] ont tenté, quelques années plus tard, de déterminer l'influence exercée par les variations du milieu intérieur des poissons, sur l'action de ces drogues. Des expériences sur le chien avaient en effet montré que, dans l'acidose expérimentale, l'action des hypnotiques est renforcée en intensité et en durée, alors qu'elle est diminuée dans l'alcalose.

Ces auteurs ont pu constater que, *par l'immersion préalable* d'épinoches dans des solutions tantôt acides, tantôt alcalines, on modifie leur réactivité vis-à-vis des substances hypnotiques comme le sonéryl, dans le même sens que pour le chien, à savoir : augmentation de la rapidité et de l'intensité des effets par immersion préalable dans les milieux acides, et effets inverses dans les milieux alcalins.

Des résultats analogues ont été obtenus en ce qui concerne l'action de l'avertine (tribromoéthanol) sur la tanche rendue préalablement acidosique par l'acide lactique ou alcalosique par la soude.

De même, en 1935, M. Tiffeneau et D. Broun [146] ont obtenu des résultats tout à fait comparables avec le bromure de propyle, résultats retrouvés plus tard par M. Tiffeneau et R. Cahen. [177]. Grâce à des analyses, ces auteurs ont pu en outre doser la quantité de substance anesthésique fixée dans le cerveau des poissons.

Leurs résultats ont permis de vérifier et confirmer les conclusions établies avec J. Lévy : après action des acides sur les animaux, le pouvoir narcotisant paraît résulter d'une augmentation de la réceptivité des centres nerveux se traduisant par la présence d'une plus petite quantité d'hypnotique dans les centres, plutôt que par une pénétration quantitativement plus considérable de la substance anesthésique. Par contre les alcalis prolongent le « temps d'endormissement » par augmentation de la perméabilité des branchies et diminution de la réceptivité des centres nerveux.

D'autre part, guidés par les constatations de H. H. Meyer et de Unger concernant la sensibilité de têtards ou de poissons à l'action de l'alcool, de l'acétone ou du chloral en fonction de la température des solutions, M. Tiffeneau et D. Broun [145] ont entrepris l'étude de l'influence de ce facteur sur la production de la narcose par le bromure de propyle chez le goujon.

Ils ont noté que, chez des animaux maintenus à 25°, l'abolition de la réflectivité se produit en moitié moins de temps que chez des animaux maintenus à 15°. Les quantités de narcotique fixées dans le cerveau, par unité de poids et de temps, étant deux fois plus grandes chez les animaux placés à 25° que chez ceux maintenus à 15°.

M. Tiffeneau et R. Cahen [148] ont alors, dans une série d'expériences analogues, cherché à expliquer le mécanisme d'action de la température sur la narcose.

Les résultats obtenus, en dosant la quantité de bromure anesthésique dans l'encéphale au moment où se produit le phénomène adopté comme test de l'anesthésie, ont conduit ces auteurs à admettre que l'influence favorisante de la température sur la vitesse de production de l'état anesthésique s'exerce sur les facteurs physiques qui conditionnent cette anesthésie. Ils ont en effet constaté l'accroissement de la vitesse de pénétration branchiale et de la fixation par l'encéphale. Ces constatations permettent de rejeter l'hypothèse accréditant une plus grande sensibilisation de la cellule nerveuse sous l'influence de la tempé-

rature, action qui, dans ce cas, se traduirait par la présence de quantités moindres de poison dans le cerveau des animaux.

En 1929 et les ânnées suivantes, L. Binet a entrepris avec plusieurs collaborateurs de nombreuses recherches en utilisant les poissons comme animal réactif. Ayant rappelé les services que pouvaient rendre les poissons dans l'étude des substances toxiques, en raison des particularités de l'anatomie du système circulatoire de ces animaux, il a, avec G. Morin, A. Arnaudet, H. Cardot et V. Bonnet, [14-15-16-17], mis en évidence, par des expériences de perfusion sur la tête isolée de poissons, l'influence des variations de la concentration en ions H sur le fonctionnement des centres nerveux, un déplacement vers l'alcalinité diminuant la durée de survie ; un déplacement vers l'acidité étant au contraire bien mieux supporté.

Avec les mêmes collaborateurs [18], L. Binet a ensuite entrepris l'étude de diverses substances pharmacologiques comme la caféïne, capables d'exciter les centres respiratoires antérieurement inhibés par le chloroforme.

Ayant adopté pour tous sès essais les conditions expérimentales précédemment établies par E. Bachrach (température, forme des récipients et volume des solutions), L. Binet a montré avec Zamfir [26] la possibilité d'une accoutumance des poissons au tabac et à la nicotine dont il a souligné l'action nocive sur l'activité des centres nerveux supérieurs.

Il a ensuite avec G. Morin [20-21-22-23-24] signalé l'influence de la température sur la sensibilité des poissons soumis à l'action de l'avertine, de la strychnine et de l'acide lactique, vérifiant et confirmant les résultats trouvés par Ch. Richet, P. Portier et J. Lopez-Lomba.

Poursuivant cette série de travaux, L. Binet [9-10-11-12] a montré l'intérêt qu'il y a, en biologie, à recourir au réactif qu'est le poisson, pour élucider les intoxications et approfondir leur traitement. Il a en effet, avec Ch. Jaul-

MES [19], étudié l'intoxication uranique chez les poissons, et sa thérapeutique bicarbonatée.

L. BINET et P. NICOLLE [12] ont ensuite effectué des recherches concernant l'action du chlorure de sodium sur la toxicité du chlorure mercurique. Confirmant les travaux de P. PORTIER et ses collaborateurs, ces auteurs ont pu, une fois encore, vérifier que, sans période préparatoire, des épinoches peuvent vivre dans une solution saline à 10 g. 0/00, qu'elles ne présentent aucun trouble apparent pendant plus de 48 heures dans une solution à 20 g. 0/00 et qu'elles survivent encore plusieurs heures dans des solutions à 30 g. 0/00. Ayant observé en outre que les résultats obtenus avec l'eau de Seine étaient assez différents, ils ont toujours effectué leurs expériences avec de l'eau de source de la canalisation de Paris maintenue à la température de 18°.

Ils ont pu ainsi observer l'abrègement du temps de survie par addition de faibles quantités de chlorure de sodium (0 g. 25 à 1 g. 0/00) aux solutions de chlorure mercurique ; l'augmentation de la durée de survie pour des doses moyennes de sel (2 à 6 g. 0/00), et à nouveau le raccourcissement pour des doses fortes (7 à 15 g. 0/00), phénomène qu'ils ont expliqué par le fait que l'ion sodium accroît la perméabilité cellulaire et que, pour de faibles concentrations en chlorure de sodium, seule cette action se fait sentir. Elle facilite la pénétration du toxique. Pour les doses moyennes, l'addition de chlorure de sodium à une solution de chlorure mercurique diminue la dissociation électrolytique de ce dernier, et par là même, rend ce poison moins efficace. De plus, il se formerait des ions complexes dont la toxicité serait moindre que celle du sublimé. Enfin, pour les doses fortes, le temps de survie serait de nouveau abrégé en raison des lésions qui se produisent au niveau de l'épithélium branchial sous l'influence du déséquilibre osmotique brutal, et qui diminueraient la résistance des épinoches au poison.

L. BINET a ensuite, avec L. PEREL, [12] consacré ses recherches à l'étude, sur le vairon (*Phoxinus laevis*), du

pouvoir antitoxique du glutathion et du chlorhydrate de cystéine vis-à-vis du venin de Cobra. Poursuivant ses recherches, il a pu montrer avec E. Robillard, [12] en utilisant des gobies, que d'autres composés sulfhydrilés partageaient ce pouvoir antitoxique, et avec G. Weller [12], que des composés soufrés étaient susceptibles d'apporter un grand bien dans l'intoxication des vairons par le sulfure d'éthyle dichloré. Il a pu enfin, avec Ch. Achard [13], mettre en évidence le pouvoir neutralisant de l'hyposulfite de sodium sur l'intoxication de carpes d'étang par le cyanure de potassium et avec L. Perel [25], le même pouvoir neutralisant de composés soufrés au cours de l'intoxication saturnine et de l'intoxication benzolique chez les vairons.

Toutes ces expériences ont permis à L. Binet de conclure à l'utilité de l'expérimentation poursuivie sur le poisson, moyen précieux pour l'étude de diverses intoxications (plomb, gaz d'éclairage, cyanure de potassium, etc.), pour certaines recherches endocrinologiques, et enfin pour l'étude de l'hyperthermie et de la fonction respiratoire.

Dans un ensemble de documents, N. Kawamoto [66] mettra lui aussi en évidence les principales applications des poissons comme réactif biologique : étude de toutes les substances solubles et diffusibles à travers les branchies dont la perméabilité a fait l'objet d'une intéressante étude de Angel Kerr.

En 1919, F. Mercier et G. Valette [99] ont entrepris une étude comparative des actions anesthésiques de la novocaïne gauche et de la pseudocaïne droite sur les poissons.

Ils ont utilisé la technique décrite par les auteurs américains, H. Adams et ses collaborateurs. Les phénomènes observés sont analogues à ceux précédemment décrits par ces auteurs et par F. Brémaud : « L'animal présente une période d'excitation beaucoup plus intense et de beaucoup plus longue durée pour la pseudocaïne droite que pour la novocaïne gauche ; les mouvements respiratoires sont alors

rapides et irréguliers. Puis l'animal se calme, la respiration devient de plus en plus faible, il perd le sens de l'équilibre, nage pendant un certain temps couché sur le côté, puis tombe bientôt au fond du récipient, immobile. Si on touche alors légèrement les nageoires avec une baguette en verre, l'animal, complètement insensible, ne réagit plus ; il est en état «d'anesthésie généralisée». En effet, si on le lave à l'eau pure, et qu'on le place dans un vase rempli d'eau de source, on voit, au bout d'un certain temps plus ou moins long, les mouvements et la respiration reprendre. »

Les auteurs ont ainsi pu déterminer le temps nécessaire pour obtenir l'anesthésie totale, en faisant varier la concentration des solutions de pseudococaïne droite ou de cocaïne gauche. Leurs résultats, confirmant ceux trouvés par J. Régnier et F. Mercier sur les nerfs sensitifs isolés (sciatique de grenouille, lingual du chien), ont montré que le pouvoir anesthésique du chlorhydrate de pseudococaïne droite est en moyenne 2,5 fois plus grand que celui de la cocaïne ordinaire.

« Si l'on admet, comme P. Regnard, que les phénomènes d'anesthésie généralisée produits sur les poissons par les anesthésiques locaux sont dûs à l'action anesthésique locale de ces corps sur les nerfs branchiaux (l'anesthésie de ces nerfs ayant comme corollaire l'abolition du réflexe respiratoire, et par suite, l'arrêt du mouvement des ouïes et de la bouche), les deux méthodes : essais d'anesthésie sur les nerfs isolés, et essais d'anesthésie sur les poissons doivent être similaires, et donner des résultats concordants, ce que confirment les expériences. »

L'emploi des racines de Derris comme poison pour les poissons, par les habitants des contrées où pousse cette drogue a conduit W.-A. Gersdorff [53] à utiliser ces animaux pour l'étude de la toxicité de la roténone. Il a, comme P. Pittenger et Ch. Vanderkleed d'une part, et Ed. B. Powers d'autre part, utilisé le poisson rouge, *Carassius aureatus*, mieux adapté aux conditions de l'eau non courante des récipients que la plupart des poissons indigènes.

Se conformant à la technique générale décrite par Ed. B. Powers, W. A. Gersdorff a cependant insisté sur quelques détails expérimentaux importants. Ayant vérifié que de faibles variations de température influent très nettement sur la résistance des poissons et sur la valeur du métabolisme, comme l'avait déjà signalé M. M. Wells, et comme le signalera à nouveau Baudin, [6-7-8], W. A. Gersdorff a veillé à ce que les animaux utilisés soient ou bien prélevés dans un réservoir chauffé approximativement à la même température que celle des solutions d'essai, ou amenés progressivement à cette température, avant que l'essai soit entrepris. Il a ensuite décrit les conditions expérimentales : forme des récipients, volume des solutions, taille des animaux qui doit être aussi uniforme que possible, les poissons de grande taille paraissant survivre plus longtemps que les petits.

Le choix du « critérium de toxicité » paraît avoir particulièrement retenu son attention. W. J. V. Osterhout [93] avait déjà montré que ce critérium de toxicité n'était par parfaitement satisfaisant ; « la courbe de la mort étant assymptotique », il est à peu près impossible de déceler l'instant précis de la mort.

W. A. Gersdorff a constaté lui aussi, la grande difficulté que l'on a à préciser le moment exact de la mort : on observe en effet une série de phénomènes (perte de l'équilibre suivie de l'immobilité et de la perte des réflexes) ; il faut alors une observation très minutieuse pour distinguer les mouvements des ouïes et de la bouche qui peuvent être très faibles.

W. A. Gersdorff a alors fait appel à un artifice : quand aucun mouvement de la bouche et des ouïes n'est plus perceptible, on place au bout de 4 minutes le poisson dans de l'acide chlorhydrique 1/3. Les poissons qui ne sont pas morts réagissent dans l'acide ; ceux qui ne réagissent pas peuvent être considérés comme morts.

Toutefois, il préconise l'emploi de six à douze animaux pour chaque expérience, ce qui permet de diminuer

les erreurs d'observation et les effets de la sensibilité individuelle.

Les résultats ont été, comme ceux de Ed. B. Powers, traduits par des courbes tracées en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée les temps de survie. W. A. Gersdorff a lui aussi, adopté, pour exprimer la toxicité de la roténone, la formule de Ed. B. Powers :

$$T = \frac{\sqrt{\operatorname{tg} \theta}}{a}$$

(θ étant l'angle formé par la courbe théorique de « rapidité de mortalité », courbe inverse de l'hyperbole primitive, avec l'axe des x, « a » étant le « seuil théorique de toxicité »).

Plusieurs autres auteurs, Chevallier [35] et R. Sigalas [140], avaient déjà utilisé les poissons pour l'étude des pyréthrines. R. Sigalas avait en particulier signalé que l'activité de ces drogues variait notablement selon l'espèce des poissons mis en œuvre, mais était par contre absolument indépendante du poids de l'animal.

Dans leurs travaux sur la roténone et les pyréthrines, O. Gaudin [52], R. Combette et R. Legendre [40] ont confirmé à nouveau la notable influence de l'espèce sur la sensibilité des animaux. Ces variations de sensibilité des diverses espèces seront d'ailleurs une fois de plus vérifiées par A. E. Cole [38] avec un autre toxique : le méthylmercaptan.

En 1930, deux auteurs américains, D. J. Verda et W. P. Elhardt [59] ont proposé une nouvelle méthode permettant de caractériser l'état d'anesthésie chez les poissons. Cette méthode consiste, à l'aide d'un dispositif approprié, à envoyer des excitations électriques à intervalles réguliers dans la solution anesthésique à essayer contenue dans un récipient dans lequel on a introduit un poisson. Celui-ci réagit à ces excitations par une secousse de tout le corps. Au fur et à mesure de l'anesthésie, la réaction de l'animal est moins violente, et se réduit à une contraction musculaire locale de la queue, tandis qu'apparais-

sent, à une observation minutieuse, des convulsions comparables aux « convulsions de l'éther ».

A la même époque, l'Allemand W. Blume [28], dans une étude relative à l'action de la strychnine et des phénols sur les poissons, a constaté que les animaux qu'il a utilisés mouraient plus vite dans l'eau courante, et a admis qu'il était préférable de ne pas renouveler l'eau des aquariums, en assurant cependant son aération. Il a ensuite poursuivi des recherches concernant l'action sur les poissons de la strychnine injectée par voie intrapéritonéale, technique utilisée également par A. B. Key et N. A. Wells [68] pour l'étude de l'action anesthésique de l'amytal et par J. Lévy [79] pour l'étude du pyrèthre.

Citons enfin la « contribution à l'étude de l'action toxique du pH des eaux douces sur quelques poissons » dans laquelle G. M. F. Cassaigne [34] a apporté, en 1935, d'intéressantes précisions concernant l'influence de la réaction du milieu ambiant sur la physiologie de ces animaux.

Il ressort de ces essais, effectués avec de l'eau de ville et de l'eau distillée, que l'action toxique du pH est, en ce qui concerne l'eau de ville, due à deux causes :

1°) à l'acide libre ;

2°) aux produits de réaction de l'acide sur les sels de l'eau. Il se forme en effet de l'acide carbonique dont l'action fâcheuse et rapide est bien connue.

G. M. F. Cassaigne a ensuite déterminé les « pH inoffensifs » et les « pH mortels » dans l'eau distillée et dans l'eau calcaire, pour diverses espèces de poissons. En zone acide, les pH mortels sont 3,4 pour les cyprinides et 2,9 pour les poissons rouges dans l'eau distillée ; dans l'eau calcaire, ils sont 3,2 pour les cyprinides et 2,9 pour les poissons rouges.

Enfin en zone alcaline, les pH mortels sont 10,3 pour les cyprinides et 11,2 pour les poissons rouges dans l'eau distillée, alors que le pH mortel est 10,5 pour les cyprinides et les poissons rouges dans l'eau calcaire.

Les travaux les plus récents ayant utilisé les poissons comme réactif biologique sont ceux de J. Delga [41], de G. Valette [156-157-158] et ceux de R. Lhotte [83], effectués depuis 1940.

J. Delga [41] a étudié la toxicité et la pénétration des composés de l'arsenic chez les poissons en déterminant d'une part la durée de survie des animaux dans les solutions arsenicales, et d'autre part, en dosant la quantité de toxique que les poissons ont absorbée.

G. Valette [156-157-158] a, pour sa part, entrepris un travail très détaillé sur l'action toxique des sels biliaires et des savons de sodium pour les poissons, et de l'action favorisante des savons sur la toxicité de la strychnine pour les épinoches. Il a en particulier étudié d'une manière approfondie l'importance du pouvoir tampon des solutions utilisées sur l'action toxique ou hémolytique de ces différents corps. Il a constaté d'une part que la toxicité des sels biliaires était plus grande dans des solutions de pH acide que dans des solutions de pH alcalin et d'autre part que l'on pouvait provoquer un retard à l'intoxication par addition d'une substance tampon aux solutions, et plus spécialement lorsque celles-ci sont effectuées avec de l'eau distillée, cette substance tampon évitant l'acidification du milieu par le gaz carbonique provenant de la respiration des animaux. Mais, si la présence d'une telle substance évite les variations de pH au cours des essais, la proportion dans laquelle elle doit être ajoutée est un facteur important pour la détermination de la toxicité d'un produit si cette toxicité varie avec la réaction ionique du milieu.

G. Valette conclut d'autre part que, en ce qui concerne la toxicité de différents savons de sodium, on peut diviser ceux-ci en deux groupes :

1°) Ceux dont la toxicité augmente avec un pH acide (laurate, ricinoléate, dibromoricinoléate de sodium).

2°) Ceux dont la toxicité augmente au contraire avec l'alcalinisation du milieu (oléate, linoléate, hydrocarpate de sodium).

A l'exception de ceux concernant le laurate de sodium, les résultats sont influencés de la même façon par la réaction ionique des solutions, que l'on considère leur action toxique sur les poissons ou sur les œufs d'oursins.

Il a enfin montré, dans d'autres essais, que la présence de savons dans les solutions augmente la toxicité de la strychnine pour le poisson en abaissant la tension superficielle et en augmentant la perméabilité de l'épithélium branchial.

Tout récemment, enfin, R. Lhotte [83] a apporté une contribution à l'étude de la physiologie des poissons en fonction de la salinité du milieu où ils vivent.

De l'examen de ces travaux, il apparaît que les techniques utilisées présentent, dans l'ensemble, un grand nombre de caractères communs ; cependant plusieurs auteurs ont mis en évidence l'influence particulière de certains facteurs. Il est d'ailleurs à remarquer que ces auteurs n'attribuent pas tous la même importance aux facteurs considérés.

Il nous a paru intéressant avant d'entreprendre nos essais sur l'action des anesthésiques, de grouper ces éléments mis en évidence dans les précédents travaux, et d'en faire un étude critique à la lumière de laquelle nous nous proposerons d'établir une technique.

II) Facteurs conditionnant l'emploi des poissons comme réactif biologique.

Espèce : La facilité d'approvisionnement et la possibilité de conserver facilement les poissons au laboratoire paraissent seules avoir guidé les auteurs dans leur choix : H. Fuhner, en effet, a recommandé, pour l'étude de narcotique, d'employer les vairons de préférence aux truites qui ont un trop grand besoin d'oxygène. W. A. Gersdorff a préconisé pour sa part d'utiliser, pour les essais au laboratoire, les poissons rouges qui font partie de la famille des carpes, et qui, vivant dans les eaux stagnantes sont, de ce fait, mieux adaptés que la plupart des poissons indigènes aux conditions de la vie dans les aquariums. Ces derniers,

habitués à vivre en eau courante froide, sont facilement asphyxiés dans de l'eau non courante comparativement plus chaude. En outre, il est relativement plus facile de se procurer des poissons rouges en grandes quantités et ils sont peu coûteux.

Cependant, la sensibilité des poissons aux différentes drogues et toxiques pouvant varier d'une espèce à l'autre, il est nécessaire, une fois le choix fixé, d'y persévérer.

J. Lévy n'a en effet pas obtenu des résultats semblables, selon qu'elle a opéré avec *Gobius lota* ou *Gobius paganellus*, cette dernière espèce étant plus sensible à certains hypnotiques.

J. Lopez-Lomba a, d'autre part, constaté que la sensibilité de poissons d'espèces différentes vis-à-vis de substances toxiques varie dans des limites assez larges : une même concentration de strychnine provoque en effet la mort en 44 minutes chez l'anguille, en 52 minutes chez l'épinoche, en 86 minutes chez le vairon, et en 3 heures et demie chez le poisson rouge.

Des conclusions analogues furent obtenues par K. E. Carpenter, R. Sigalas, O. Gaudin, R. Combette et R. Legendre, par A. E. Cole dans l'étude de la toxicité des sels de plomb, des pyréthrines, de la roténone et du méthylmercaptan, et enfin par M. A. Dissard et J. Noé qui ont supposé que ces différences dépendent de l'habitat normal des animaux.

Seul R. Wasicky, en faisant agir l'extrait de fougère mâle sur différentes espèces de poissons a observé par contre, que la sensibilité de ces animaux n'est nullement fonction de l'espèce.

Saison : La saison pendant laquelle sont effectués les essais ne semble pas avoir retenu l'attention de nombreux chercheurs. Seuls, P. Portier et F. Gueylard ont signalé que la résistance des poissons diminue pendant la période du frai ; cependant, quelques auteurs, L. Lendle, K. E. Carpenter, et W. Blume ont précisé l'époque pendant laquelle ils ont effectué leurs expériences.

Taille et poids des animaux : De nombreux essais ont, par contre, cherché à mettre en évidence l'influence de la taille et du poids des animaux sur leur sensibilité aux différentes drogues.

Pour quelques auteurs, cette influence est certaine. J. Lopez-Lomba a en effet constaté que des différences aussi faibles que 0 g. 05 pour des poissons de 1 à 3 grammes sont susceptibles de modifier les résultats. Il recommande donc l'emploi d'animaux de poids parfaitement semblables, et autant que possible de même sexe. Ces conclusions ont été vérifiées et confirmées plus tard par P. Duquénois.

W. A. Gersdorff a signalé, comme l'avait fait K. E. Carpenter en ce qui concerne les sels de plomb, que les gros poissons seraient plus résistants que les animaux de petite taille à l'action de la roténone.

Par contre, un grand nombre de chercheurs ont été amenés, à la suite de leurs essais, à conclure que la taille et le poids des animaux n'influent nullement sur les résultats.

Une telle constatation a été faite par P. Pittenger et Ch. Vanderkleed qui ont signalé qu'une différence de taille allant du simple au double reste sans influence sur l'action de la digitale ; par R. Wasicky dans une étude de la fougère mâle ; par les auteurs américains R. Adams, E. K. Rideal, W. B. Burnett, R. L. Jentins et E. E. Dreger dans leur étude sur les paraaminobenzoates d'alcoyl ; et enfin par R. Sigalas dans ses essais des pyréthrynes sur les hypocampes et les gobies.

Volume du liquide et dimension des récipients : Comme nous l'avons vu, Ch. Richet a souligné l'importance de la dimension et de la forme des récipients utilisés, et surtout celle du rapport entre le poids de l'animal et le volume de la solution, un milieu confiné devenant en effet rapidement toxique par suite de l'absence d'oxygène et de la présence de gaz carbonique. Ses conclusions ont démontré la nécessité de l'emploi de récipients larges et bas ; elles ont été confirmées par les précisions que E. Bachrach a

apportées sur les valeurs optima de volume et de surface des récipients pour la vie des poissons.

Lumière : Ce même auteur a en outre signalé que, toutes choses égales d'ailleurs, la survie des poissons est plus grande à l'obscurité qu'à la lumière, mais il ne nous a pas été donné de retrouver ailleurs une pareille constatation.

Nature de l'eau : Dans un très grand nombre d'essais, les auteurs ont cherché à élucider dans quelle mesure la nature de l'eau employée pour la préparation des solutions a une influence sur la résistance des poissons.

Si l'eau de mer a toujours été employée pour les poissons marins, et si, dans un grand nombre de travaux, l'eau distillée ou l'eau de source ont été employées indifféremment, de nombreux auteurs ont apporté d'intéressantes précisions sur les avantages ou les inconvénients de l'eau distillée ou de l'eau de source.

A l'exception de K. E. Carpenter qui considère que l'eau distillée n'est absolument pas toxique pour les poissons qu'elle a pu y faire vivre cinq semaines, presque tous les auteurs : S. Ledebt, Ed. B. Powers, J. Lopez-Lomba, F. Gueylard, R. Adams et ses collaborateurs sont d'accord pour considérer que l'eau distillée est plus ou moins toxique pour les poissons, et que cette toxicité serait due aux sels de cuivre ou de plomb ou encore à l'ammoniaque. S. Ledebt observe en outre, comme nous l'avons exposé plus haut, que cette toxicité est due aussi à un manque de sels et à des variations de tension osmotique.

Les poissons supportent par contre bien mieux la sursalinité de l'eau, comme l'ont montré Ch. Richet, M. Cololian, S. Ledebt, P. Portier et M. Duval, F. Gueylard, Oxner et enfin L. Binet et P. Nicolle.

De toutes façons, la grande aération de l'eau semble indispensable pour pouvoir conserver des poissons au laboratoire. La nécessité de cette aération a été parfaitement

montrée par Ch. Richet, H. Fuhner, L. Lendle, Behrend Berhens et W. Blume. Ce dernier auteur préconise pourtant, d'une manière qui semble un peu paradoxale, de ne pas placer les poissons dans de l'eau courante où la mortalité serait plus importante.

Si l'on considère le grand nombre de travaux qui ont eu pour but de déterminer leur influence sur la vie des poissons, on peut admettre que deux facteurs, la température et la réaction de l'eau, doivent avoir une importance considérable.

Température : Nous avons vu, en effet, d'après les essais de P. Regnard, de Maurel et Lagriffe, de M.M. Wells, de Baudin et de W. A. Gersdorff que les changements brusques de température provoquaient des phénomènes de choc chez les poissons. Afin d'éviter ces pertubations plusieurs auteurs ont recommandé d' « accoutumer » les animaux à la température des essais, et de maintenir celle-ci constante pendant toute la durée des mesures. P. Pittenger a fixé à une heure au moins, ce « temps d'accoutumance », alors que R. Adams et ses collaborateurs et W. A. Gersdorff ont préconisé une accoutumance de plusieurs heures. J. Lopez-Lomba a, de son côté, souligné la nécessité de maintenir constante la température des solutions pendant la durée des expériences.

En outre, de très nombreux auteurs ont constaté que l'accroissement de la température augmente la sensibilité des poissons à l'action des toxiques. Ce phénomène a été observé par Ch. Richet avec des sels métalliques, par P. Pittenger et Ch. Vanderkleed avec des produits digitaliques, par Unger pour le choral, par Ed. Powers, par P. Portier et J. Lopez-Lomba, R. Adams et ses collaborateurs, K. E. Carpenter, W. A. Gersdorff, L. Binet et G. Morin et enfin par M. Tiffeneau et D. Broun avec les drogues les plus diverses.

Réaction du milieu : De nombreux travaux ont montré que l'acidité ou l'alcalinité du milieu ne sont com-

patibles avec la vie des poissons que dans certaines limites de pH que G. M. F. Cassaigne a appelés « pH inoffensifs ». En dehors de ces limites, les animaux présentent des troubles qui sont d'autant plus accusés que l'on s'éloigne davantage des pH optima. Des conclusions analogues ont été formulées par Ch. Richet, J. Lopez-Lomba, K. E. Carpenter, F. Gueylard et M. Duval. Ces derniers auteurs ont en outre précisé que la toxicité n'était pas seulement imputable à la concentration en ions H, mais aussi à la nature de l'acide ou de la base utilisés.

L'acidité et l'alcalinité, ont, de l'avis de tous les auteurs qui ont étudié cette question, une influence très nette sur la pénétration des toxiques chez les poissons. D'après Em. Hédon, J. Lopez-Lomba, J. Lévy et R. Hamet, L. Binet, A. Arnaudet et H. Cardot, l'alcalinité faciliterait la pénétration des toxiques, résultats que P. Portier et J. Lopez-Lomba ont attribué au fait que la mucine des branchies est soluble dans les solutions alcalines, et précipitée par les acides, ce qui serait défavorable à l'absorption.

M. Tiffeneau et ses collaborateurs auraient, par contre, constaté que les toxiques pénétreraient moins rapidement, dans les organismes rendus préalablement alcalosiques, et au contraire plus rapidement chez des animaux acidosiques. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer, si l'on considère que M. Tiffeneau et ses collaborateurs ont, pour évaluer la rapidité de pénétrations de toxiques, utilisés des animaux rendus *au préalable* acidosiques ou alcalosiques par immersion dans des solutions acides ou alcalines ce qui a provoqué une modification de leur réactivité vis-à-vis des substances hypnotiques auxquelles ils ont été soumis ensuite. Des analyses ont permis de montrer que ces modifications de sensibilité des poissons en état d'acidose ou d'alcalose peuvent être attribuées à une variation de réceptivité des centres nerveux, variation dont l'influence est manifestement plus importante que la modification de la perméabilité de la branchie. Dans les expériences des au-

tres auteurs au contraire, les poissons sont directement immergés dans les solutions acides ou alcalines de toxiques, et dans ce cas, les modifications de perméabilité de la branchie doivent avoir une influence plus marquée que les variations de réceptivité des centres nerveux.

G. Valette, dans ses travaux, a mis en lumière l'influence de la réaction ionique du milieu sur la toxicité des sels biliaires et de divers savons de sodium. Il a pu mettre en évidence que les sels biliaires et un certain nombre de savons sont plus toxiques pour le poisson lorsque le pH des solutions est plus acide. Ces résultats semblent être à première vue en opposition avec l'opinion générale des différents auteurs se rapportant à l'influence du pH des solutions sur la pénétration de différents produits à travers l'épithélium branchial ; mais, comme l'a montré L. Binet et ses collaborateurs dans leur étude sur le bromure de propyle, l'influence du pH s'exercerait d'une part sur la perméabilité des branchies, et d'autre part sur la réceptivité des cellules sensibles. Or, dans le cas des sels biliaires et des savons de sodium, des expériences effectuées avec des réactifs biologiques autres que les poissons ont montré que ces substances ont une action toxique plus grande en milieu acide. L'augmentation de la réceptivité serait donc plus marquée que la diminution de perméabilité des branchies. Cette explication semble être confirmée par le fait que, dans le cas des sels de sodium qui, en solution alcaline, sont plus toxiques pour les autres réactifs biologiques, la toxicité est aussi plus grande pour les poissons, les deux phénomènes, augmentation de réceptivité et augmentation de perméabilité en milieu alcalin, exerçant leur influence dans le même sens. A ces deux phénomènes vient encore s'en ajouter un troisième, à savoir la diminution de la tension superficielle par la présence des savons.

Techniques utilisées : A part de rares exceptions, où les drogues ont été injectées par voie intrapéritonéale (A. B. Key et N. A. Wells, W. Blume et J. Lévy),

les essais ont, en général, consisté à immerger les poissons dans les solutions à étudier, et à noter les phénomènes observés. Ce qui différencie les diverses techniques, c'est la façon d'apprécier le terme de la réaction. Le test le plus simple semble être, à priori, l'observation de la mort de l'animal. Cependant, comme nous l'avons vu, W. J. V. Osterhout a montré que la mort ne se produit pas d'une façon brutale, et que la courbe qui traduit son apparition est une courbe assymptotique, de sorte que ce critérium n'est pas satisfaisant. C'est cependant ce « test » qu'ont choisi Ch. Richet, P. Pittenger et Ch. Vanderkleed, Ed. B. Powers, J. Lopez-Lomba, R. Wasicky, K.-E. Carpenter, W. A. Gersdorff. A leur avis, si sa précision n'est pas absolue, elle est bien supérieure à celle de tout autre critérium.

Mais, peu d'auteurs ont précisé dans leurs ouvrages quel phénomène, quelle observation pouvait leur faire affirmer la mort certaine de l'animal.

J. Lopez-Lomba a cependant signalé que l'on pouvait constater la mort du poisson, en vérifiant sous le microscope l'arrêt de la circulation sanguine dans les capillaires des nageoires.

W. A. Gersdorff qui a signalé, lui aussi, la grande difficulté de saisir avec netteté l'instant de la mort par une simple observation des mouvements des ouïes, de la bouche et des nageoires, a considéré comme mort, tout animal qui, en état de mort apparente, ne réagit pas quand on le place dans une solution d'acide chlorhydrique 1/3.

D'autres auteurs enfin ont fixé comme terme de réaction un phénomène précis, observé au cours de l'intoxication, variant selon la nature du toxique.

Pour L. Binet, c'est le temps nécessaire pour obtenir les mouvements convulsifs spontanés avec la strychnine. J. Lévy détermine deux phases de réaction correspondant à une hypnose légère et à une hypnose profonde provoquées par des médicaments de la série barbiturique. L. Lendle, dans une étude sur les narcotiques, recherche ce qu'il appelle

la « réaction du filet négative » que nous avons précédemment définie.

Dans leurs recherches consacrées à l'étude de divers hypnotiques et anesthésiques, M. Tiffeneau et ses collaborateurs ont choisi, comme terme de réaction, l'immobilité complète de l'animal persistant après excitation mécanique des nageoires caudale et dorsale, la respiration et les réflexes étant conservés.

De même R. Adams et ses collaborateurs, et plus tard F. Mercier et G. Valette, ont estimé que l'animal est anesthésié lorsqu'il est insensible à un léger coup porté sur les nageoires avec une baguette en verre.

D. J. Verda et W. P. Elhardt enfin, ont apprécié l'anesthésie d'après les modifications des réactions des poissons soumis à des excitations électriques.

De tous ces travaux, il résulte en outre que l'on ne peut apprécier nettement le terme des réactions qu'en opérant dans des limites de temps définies. L'observation perd son caractère de précision lorsque les phénomènes d'intoxication se produisent dans un temps trop court, l'erreur relative dans l'estimation des temps de survie risquant alors d'être considérable. Lorsque, par contre, l'intoxication dure trop longtemps, les phénomènes qui la caractérisent apparaissent avec beaucoup moins de netteté.

Ces faits ont été clairement établis par P. Pittenger, Ed. B. Powers, L. Lendle, R. Adams et par W. A. Gersdorff qui ont fixé pour leurs essais des limites de temps maxima au delà desquelles ils n'ont pas tenu compte des résultats. En outre, afin de réduire au minimum les causes d'erreur dues aux variations individuelles de réactivité des organismes vivants tels que les poissons, ces auteurs ont conseillé l'emploi d'un grand nombre d'animaux pour chaque essai.

Après avoir passé en revue les travaux des différents auteurs, nous avons pu mettre en évidence un certain

nombre de facteurs intervenant dans ces essais. Il nous est maintenant possible d'entreprendre la mise au point d'une technique personnelle adaptée à l'essai des produits anesthésiques que nous nous proposons d'étudier.

L'établissement de cette technique et l'exposé des premiers résultats obtenus feront l'objet du chapitre qui va suivre.

CHAPITRE II

TECHNIQUE UTILISÉE

APPLICATION A L'ÉTUDE DU CHLORHYDRATE DE COCAINE

D'après les travaux que nous venons d'exposer, il apparait que les divers auteurs n'ont pas toujours parfaitement précisé les techniques qu'ils ont utilisées. Plusieurs facteurs expérimentaux ont fait en outre l'objet de nombreuses recherches dont les conclusions, souvent différentes, sont parfois contradictoires.

Dans ce chapitre nous nous proposons de reprendre point par point l'étude des différents facteurs qui semblent avoir une influence sur les résultats afin d'en déterminer l'importance.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ÉTABLIES D'APRÈS LES TECHNIQUES D'AUTRES AUTEURS

1°) **Choix de l'espèce :** Nous avons choisi comme animal d'expérience, l'épinoche, *Gasterosteus aculeatus* (aiguillonnée) de la famille des Gastérostéidés, poisson d'eau douce vivant dans nos rivières et dont l'approvisionnement est relativement facile.

C'est un poisson de petite taille, deux à six centimètres environ, de couleur « vert de mer », présentant sur

la région dorsale en général trois, parfois deux ou quatre forts aiguillons.

Cette espèce a déjà souvent été utilisée pour des essais de toxiques et même d'anesthésiques. Elle présente l'avantage de s'adapter sans inconvénient à la vie dans les aquariums. La petite taille de ces poissons permet d'en conserver un grand nombre au laboratoire, et d'être ainsi assuré que les animaux qui servent pour une même série d'essais sont de même provenance et que leurs conditions de vie sont similaires.

2°) **Volume des solutions. — Forme des récipients :** Nos poissons ont toujours été conservés au laboratoire dans un grand bac en faïence à eau courante servant d'aquarium et nous avons toujours eu soin de ne pas en garder trop longtemps à l'avance, comme le recommande M. Goldsmith. Leur nourriture était constituée par des daphnies mortes, par de la « poudre pour poisson » que l'on trouve dans le commerce, ou mieux encore, par de petits vers rouges. Mais nous avons pu constater que les épinoches peuvent vivre plusieurs semaines sans nourriture, et nous avons toujours évité de les nourrir pendant quarante-huit heures avant les essais afin que tous les poissons mis en expérience soient dans des conditions semblables.

Lopez-Lomba, dans ses essais, a utilisé de petits ballons contenant 25 centimètres cubes d'eau ordinaire, où les poissons peuvent vivre trois à cinq jours à 20°.

Cependant, à la suite des observations de Ch. Richet, il nous a paru préférable d'effectuer nos expériences dans des récipients à large surface, où l'aération est suffisante. Il est aussi nécessaire qu'il y ait une assez grande hauteur de liquide pour que les poissons puissent nager librement.

Nous avons donc choisi des récipients cylindriques dits « vases à précipitation chaude » de forme basse, en verre Pyrex d'une contenance de six cents centimètres cubes et nous avons fixé à trois cents centimètres cubes le volume de solution à essayer, volume dans lequel nous avons tou-

jours immergé trois poissons au maximum. La hauteur du liquide est ainsi la moitié de celle du récipient, les poissons ne peuvent sauter à l'extérieur et peuvent se déplacer facilement.

DÉTERMINATION DES AUTRES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

I) **Nature de l'eau :** Nous avons ensuite examiné quelle est l'influence de la qualité de l'eau sur la vie des poissons.

Nous nous sommes d'abord assurés que l'eau de conduite distribuée au laboratoire (eau de la ville de Paris) est tout à fait atoxique pour les poissons. Nous avons ainsi constaté que les épinoches peuvent vivre parfaitement dans notre aquarium à eau courante, la mortalité n'étant en moyenne que de 1 ou 2 pour cent par semaine.

Nous avons alors cherché à mettre en évidence la toxicité de l'eau distillée, toxicité signalée par de nombreux auteurs.

Dans un premier essai nous avons préparé trois récipients remplis respectivement de :

2 litres d'eau de conduite pour le premier.

2 litres d'eau distillée provenant d'un barillet de service pour le deuxième.

2 litres d'eau distillée provenant d'une tourie de réserve pour le troisième.

Nous avons alors placé six poissons dans chacun de ces récipients qui ont été abandonnés à la température du laboratoire. Les poissons sont restés à jeun tout le temps de l'essai. Nous avons ,de plus, veillé à remplacer l'eau des récipients tous les jours avec de l'eau de même provenance et à la même température.

Nous avons groupé dans le tableau I les résultats que nous avons observés.

Nous avons recommencé un essai similaire en utilisant cette fois dix animaux pour chaque série.

TABLEAU I

Action de l'eau distillée sur les Epinoches

	Nombre de poissons survivants au bout de :				
	18 heur.	24 heur.	36 heur.	48 heur.	1 mois
Eau de conduite	6	6	6	6	6
Eau du barillet de service	2	0	0	0	0
Eau de la tourie de réserve	6	6	3	1	1

Dans l'eau de conduite, un poisson est mort au bout de trois jours (mais nous avons observé que ce poisson étant parasité par une moisissure). Les neuf autres étaient encore vivants au bout d'un mois.

Dans l'eau distillée provenant du barillet tous les poissons sont morts entre douze et quarante-huit heures.

Dans l'eau provenant de la tourie tous les poissons sont morts entre vingt-quatre et soixante heures.

Les poissons restent parfaitement normaux dans l'eau de conduite, même non courante, alors que dans l'eau distillée ils présentent, au bout de six à sept heures au minimum des troubles qui se manifestent surtout par une desquamation abondante des téguments et par un ralentissement des mouvements, ralentissement qui s'accentue de plus en plus. Finalement, les poissons s'immobilisent et leur respiration s'arrête.

La desquamation est caractéristique : les débris épithéliaux qui tiennent encore aux nageoires donnent à celles-ci un aspect frangé tout à fait particulier et on retrouve en grande abondance dans le fond du récipient ceux qui se sont détachés.

Dans nos essais, il apparaît que l'eau distillée provenant de la tourie est un peu moins toxique que l'eau provenant du barillet. Celle-ci venait d'être renouvelée avec une réserve provenant d'une bombonne déjà entamée, alors que l'eau de la tourie avait séjourné dans celle-ci pendant un mois environ, sans être agitée.

Peut-être faut-il rapprocher cette constatation d'un phénomène analogue signalé par S. Ledebt et attribué au fait du dépôt, tout au moins partiel, des substances nocives sur les parois des récipients dans lesquels l'eau séjourne assez longtemps.

Nous pouvons donc conclure que l'eau distillée est toxique pour les épinoches, mais n'ayant dans aucun cas pu observer le moindre trouble avant au moins six heures d'immersion, cette toxicité doit pouvoir être négligée dans des expériences de très courte durée.

Si l'eau de conduite paraît préférable pour tous ces essais, afin d'éviter toute action toxique surnuméraire, il nous a paru intéressant de rechercher si, en dehors de toute toxicité propre de l'eau distillée, c'est-à-dire dans des limites de temps peu étendues, la nature de l'eau influe sur l'action des anesthésiques que nous nous proposons d'étudier.

Nous reviendrons sur ce point lorsque nous étudierons en détail l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les poissons.

II. **Action du chlorhydrate de cocaïne sur les Epinoches :** Nos essais ont alors consisté à immerger des poissons dans des solutions de chlorhydrate de cocaïne et à noter leurs réactions.

Le chlorhydrate de cocaïne (chlorhydrate de méthylbenzoyl-ecgonine, C 17 H 21 NO 4 ; P. M. 339,5) que nous avons utilisé est le sel officinal.

Nous avons, pour une première série d'essais, effectué une solution de 0,10 grammes de chlorhydrate de cocaïne dans un litre d'eau de conduite, à la température du laboratoire. La solution ainsi obtenue à un pH de 7,8. Les poissons, pêchés la veille dans l'aquarium à eau courante froide (12° à 13°), sont abandonnés pendant vingt-quatre heures dans une cuve prismatique de cinq litres, remplie de cette même eau. Au bout de ce temps l'eau de la cuve est à la température du laboratoire, soit 14°.

Un poisson est alors immergé dans la solution à 0,10 grammes pour mille de chlorhydrate de cocaïne, les conditions de forme de récipient et de volume de solution étant celles précédemment exposées, et, en comptant pour l'instant zéro le moment où le poisson est placé dans la solution, on note très minutieusement en s'aidant d'un chronomètre tous les phénomènes observés.

Nous pouvons résumer ainsi les phénomènes présentés dans ces conditions par un très grand nombre de poissons :

Dans un temps allant de une à trois minutes, les poissons semblent normaux. On peut observer ensuite des changements dans leur comportement. En général, dans un premier temps, les poissons manifestent une grande agitation et tournent rapidement autour du récipient en longeant les parois. Dans certains cas, cette agitation se prolonge, dans d'autres, elle est suivie de torpeur. A un moment donné, qui n'est pas toujours constant pour tous les individus, il se produit une perte de l'équilibre qui se manifeste d'une manière variable : parfois le poisson s'incline sur le flanc et continue à nager, ou bien il « pique du nez en avant », se redresse, sort la tête hors de l'eau avec des soubresauts, ou encore il roule sur lui-même, se met en arc, nage rapidement autour du récipient, ou enfin il se met en position verticale, la tête vers le fond et tourne sur lui-même sur un axe longitudinal comme une toupie. Tous ces mouvements sont incohérents, désordonnés, et donnent une impression d'ivresse ; aucun ne semble être plus fréquent que les autres. Ils peuvent apparaître successivement ou même simultanément.

Après cette période de déséquilibre, le poisson s'immobilise, en général au fond du récipient, parfois en surface ou entre deux eaux.

On observe en outre une très nette diminution de la pigmentation de la peau qui devient très pâle et jaunâtre.

Chez les témoins placés dans l'eau de conduite, les battements des ouïes sont de 90 à 110 par minute et sont réguliers. Au moment du transvasement dans la solution

anesthésique, le nombre des battements des ouïes augmente brusquement, parfois jusqu'à 180 par minute, mais nous pensons que cette augmentation est le fait, pour une grande part du moins, du choc provoqué par ce transvasement, car nous avons pu observer le même phénomène en remplaçant la solution anesthésique par de l'eau de conduite. Le rythme des battements diminue rapidement, puis il augmente à nouveau dès l'apparition des premières réactions anormales du poisson. Si on prolonge l'action de l'anesthésique, le rythme devient très lent, l'amplitude faible ; parfois on observe des battements très amples, saccadés et irréguliers, accompagnés souvent d'un sursaut de tout le corps de l'animal. Mais ces modifications dans le rythme des mouvements des ouïes, si elles se produisent dans la majorité des cas, ne sont ni constantes ni régulières et elles sont très difficiles à observer avec précision quand le poisson se déplace rapidement.

III) **Choix du terme de la réaction :** Nous avons alors essayé de provoquer des réflexes chez les animaux par des excitations mécaniques, soit en portant un coup brusque sur la table sur laquelle sont les récipients, soit en touchant les nageoires avec un agitateur, soit enfin en pinçant les nageoires avec une petite pince métallique.

En portant un coup sur la table, nous avons pu observer que certains poissons, placés dans de l'eau ordinaire, ont un mouvement réflexe rapide, un sursaut, souvent accompagné d'un changement brusque de direction ; mais tous les poissons ne se comportent pas de la même manière, certains ne réagissent pas du tout même en augmentant la violence du coup. Pour ceux qui réagissent en eau ordinaire, la réaction disparaît en solution anesthésique lorsque se manifestent les différents symptômes précédemment décrits, mais, là encore, la disparition ne se produit pas au bout de temps réguliers et constants.

De même, dans nos essais, les animaux ont réagi d'une manière variable à un coup porté sur les nageoires caudale

ou dorsale avec un agitateur. Il nous est d'ailleurs rapidement apparu qu'il était difficile de donner aux coups la même intensité et de frapper les poissons toujours dans la même partie des nageoires, base ou extrémité.

Richet ayant signalé que chez les poissons c'est l'extrémité de la queue qui est la partie la plus sensible aux réflexes, nous avons cherché quelle serait la réaction de ces animaux en saisissant avec une petite pince effilée, mais non piquante, la nageoire caudale ou la nageoire dorsale.

Un poisson normal répond à ce pincement par une secousse de tout le corps, et cherche à se dégager. Nous nous sommes d'ailleurs vite rendu compte qu'il fallait pincer et relâcher très rapidement, sinon, le poisson se débattant, on risque de léser les tissus des nageoires.

Chez les poissons placés dans la solution anesthésique, la violence du réflexe est tout d'abord très grande ; elle diminue peu à peu, mais tant que ce réflexe a lieu, il reste très net et facile à observer. A un moment précis on n'obtient plus aucune réponse au pincement des nageoires. Il est important de remarquer que les réponses réflexes au pincement des nageoires caudale et dorsale ne disparaissent pas toujours dans le même ordre, mais les différences de temps qui séparent les deux tests sont toujours très faibles par rapport au temps qui s'est écoulé depuis le temps initial (15 à 30 secondes pour une solution de chlorhydrate de cocaïne à 0 g. 10 pour mille à 20° pour un temps total d'environ 6 minutes).

Après la disparition de cette réponse réflexe au pincement, nous avons noté que certains poissons continuent à nager ; les réflexes spontanés ne sont donc pas abolis. D'autres au contraire sont au stade d'immobilité. Mais deux faits nous paraissent remarquables : d'une part la disparition de cette réponse réflexe se produit à des temps presque semblables pour tous les poissons placés dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à la même concentration (environ 13 minutes pour une solution à 0 g. 10 pour mille, à 14° et à pH 7,8) ; d'autre part, cette dispa-

rition est un phénomène constant et définitif quel que soit le degré apparent de l'intoxication de l'animal.

Des expériences effectuées avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne à des concentrations plus fortes et plus faibles nous ont montré que les symptômes sont les mêmes qu'à la concentration de 0 g. 10 pour mille, et apparaissent dans le même ordre. Ils sont cependant moins différenciés aux fortes concentrations, les divers degrés de l'intoxication semblent se confondre, celle-ci semble plus brutale.

Aux très fortes concentrations, les poissons tombent très rapidement au fond du récipient.

Aux faibles concentrations, au contraire, chaque phénomène observé est plus lent à se produire et dure plus longtemps avant que n'apparaisse un nouveau symptôme d'intoxication.

Si on prolonge l'action de l'anesthésique en laissant le poisson dans la solution, au bout d'un certain temps, plus ou moins long selon la concentration, l'animal finit par mourir, sans que l'on puisse saisir exactement à quel moment. Si au contraire on le remet dans l'eau de conduite, il reste dans l'état où il était pendant un temps plus ou moins long, selon la concentration, puis les mouvements redeviennent cohérents, il retrouve son équilibre et revient enfin à son état normal.

Aux très fortes concentrations, l'action de la drogue est brutale et il arrive que les poissons ne se rétablissent pas, tous ou en partie, même remis dans l'eau pure. Enfin, aux très faibles concentrations, les poissons ne semblent nullement incommodés par la présence de l'anesthésique.

Ces différentes expériences nous permettent de montrer que l'action du chlorhydrate de cocaïne provoque chez l'épinoche la perte de l'équilibre et perte de la sensibilité, mais que les symptômes qui caractérisent ces deux phénomènes ne sont ni constants ni réguliers.

Seule, la disparition de la réponse réflexe à un pincement des nageoires nous a semblé être un phénomène

constant, régulier et fonction de la concentration. Nous nous proposons donc de choisir ce « test » comme critère de l'action du chlorhydrate de cocaïne sur *Gasterosteus aculeatus*, et nous fixerons comme terme de la réaction « le moment où l'on n'obtient plus aucune des deux réponses réflexes à une excitation mécanique (pincement des nageoires caudale et dorsale) », et appellerons T le nombre de minutes nécessaires pour obtenir « l'anesthésie » ou la « narcose », c'est-à-dire le moment de la disparition de la réponse réflexe test.

IV) **Détermination de l'influence possible de l'accoutumance :** Une nouvelle série d'essais avec des poissons déjà intoxiqués une première fois avec une solution de chlorhydrate de cocaïne dans des conditions expérimentales identiques, a été effectuée deux heures, six heures, douze heures, vingt-quatre et quarante-huit heures après la guérison apparente de ces poissons. Dans aucun cas nous n'avons pu observer de différences caractéristiques dans les moyennes des temps nécessaires pour la disparition de la réponse réflexe chez des poissons neufs et chez des poissons ayant déjà servi. Il apparaît donc que la guérison doit être complète et qu'il ne doit pas y avoir de phénomènes d'accoutumance à l'anesthésique, auquel cas nous aurions dû observer des variations dans la moyenne des temps.

Quoi qu'il en soit, étant données les relatives facilités d'approvisionnement en épinoches, nous utiliserons dans tous nos essais des poissons n'ayant jamais servi précédemment.

V) **Influence de l'espèce.** — Comme nous l'avons déjà précisé, nous avons choisi l'épinoche, *Gasterosteus aculeatus*, comme animal réactif. Mais il est arrivé que nous trouvions parmi les poissons que nous nous procurions quelques spécimens qui présentaient de légères différences avec *Gasterosteus aculeatus*. Il s'agissait alors de

deux espèces voisines : d'une part *Gasterostea* (épinochette) dont la surface du corps est recouverte jusqu'à l'origine de la nageoire dorsale de plaques osseuses qui, à l'exception de la première, donnent naissance à des épines dorsales dont le nombre varie de 8 à 11 [30] ; et d'autre part *Gasterosteus pungitus*, dont le corps est allongé, vert jaunâtre, recouvert de pointillés noirâtres [30].

Il nous est rapidement apparu que ces deux dernières espèces étaient plus résistantes que *Gasterosteus aculeatus*, les temps nécessaires pour obtenir la disparition de la réponse réflexe étant plus longs.

Les chiffres relevés au cours de trois expériences différentes illustreront ces variations de résistance.

Dans un premier essai, alors que le temps nécessaire pour obtenir la disparition de la réponse réflexe est compris entre 13 et 40 minutes pour les épinoches, ce temps est de 60 minutes pour une épinochette. Dans un autre essai, il est de 12 minutes pour l'épinochette, alors qu'il est compris entre 4 et 9 minutes pour 9 épinoches. Un dernier exemple nous montre plus nettement encore cette différence puisqu'il faut un temps compris entre 61 et 69 minutes pour obtenir la disparition de la réponse réflexe chez 4 épinochettes, alors que cette disparition est obtenue entre 29 et 35 minutes pour 5 épinoches.

Dans nos premiers essais, il est arrivé que, sur dix poissons mis en expérience, il y ait une épinochette. Dans ce cas, nous n'avons pas tenu compte du chiffre aberrant obtenu avec celle-ci. Par la suite nous avons soigneusement évité d'utiliser les épinochettes pour nos essais.

VI) **Influence de la taille et du poids des animaux :** De nombreux auteurs ayant signalé l'influence de la taille et du poids des animaux sur leur sensibilité vis-à-vis de drogues diverses, nous avons entrepris une série d'essais préliminaires afin de savoir si l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les épinoches varie en fonction de la taille de ces poissons. Les animaux, une fois les réflexes

disparus, ont été prélevés avec une petite pince et placés rapidement sur un carton où l'on avait tracé une échelle graduée en centimètres et demi-centimètres. Leur taille a été comptée de l'extrémité de la tête à l'extrémité de la nageoire caudale.

Nous avons réuni dans les tableaux suivants quelques chiffres, choisis parmi un grand nombre de résultats, à différentes concentrations, qui montrent d'une façon évidente que la taille des poissons n'influence absolument en rien leur sensibilité vis-à-vis du chlorhydrate de cocaïne.

TABLEAU II

Influence de la taille des poissons sur l'action du chlorhydrate de cocaïne

I) CHLORHYDRATE DE COCAINE à 0 g. 10 0/00, pH 7,8, température 20°.

Taille en centim.	2	2,5	2,5	3	3	3,5	4	5	5,5
Temps en min.	4	5	5,5	5	4	8	7	9	4

II) CHLORHYDRATE DE COCAINE à 0 g. 05 0/00, pH 7,8, température 20°.

Taille en cent.	2,5	2,5	3	3	3	3,5	3,5	4	5	5,5
Temps en min.	15	12	14	10	6	14	14,5	11	12	9

III) CHLORHYDRATE DE COCAINE à 0 g, 25 0/00, pH 7,8, température 20°.

Taille en cent.	2	2,5	2,5	3	3	3,5	3,5	4	4	5
Temps en min.	3,5	2,5	2,5	3	2,5	2	2	3	5	2,5

Des essais ultérieurs nous permettront de conclure d'une manière analogue en ce qui concerne les succédanés de la cocaïne.

VII) **Détermination du nombre d'animaux nécessaires pour chaque essai :** Afin de réduire les erreurs dues aux variations individuelles, il est nécessaire de faire plusieurs essais et d'établir une moyenne des différents résultats obtenus.

Nous avons donc fixé à 10 le nombre d'animaux pour chaque mesure. Le résultat final sera exprimé par la moyenne des résultats obtenus dans les dix essais effectués dans des conditions d'expériences identiques.

Afin qu'aucun facteur étranger à la réaction (par exemple : modification de la nature de l'eau à la suite d'un nettoyage de conduite) ne vienne troubler la bonne marche des expériences, nous avons toujours veillé à opérer comparativement avec des poissons « témoins » placés dans la même eau de conduite, sans addition d'anesthésique.

VIII) **Influence de la température :** D'après les travaux précédemment exposés, la température semble avoir une grande influence tant sur la vie des poissons que sur leur sensibilité aux différentes drogues.

a) Action des modifications de la température du milieu sur la physiologie des épinoches. — Nos poissons étant conservés dans de l'eau courante dont la température variait de 12 à 15 degrés selon les saisons, nous avons pu observer chez ces animaux, lorsqu'on les transvasait dans des solutions à des températures plus élevées : 18, 20 ou 22 degrés, une agitation plus intense qui ne s'apaisait que lentement. Ceci vient confirmer les observations de Maurel et Lagriffe concernant l'action nuisible pour les poissons des brusques changements de température. *A fortiori*, nous pouvons penser que si nous transportons directement les poissons de l'eau froide dans une solution de température plus élevée contenant un anesthésique, la réaction des poissons vis-à-vis de cet anesthésique pourra être considérablement modifiée.

Afin d'éviter les troubles dus aux transvasement des animaux dans un milieu de température plus élevée, nous avons, comme Gersdorff l'avait préconisé, amené progressivement l'eau de l'aquarium à la température des essais par un système chauffant très simple, représenté par le schéma ci-contre. (fig. 1). Pittenger et Vanderkleed

ayant en outre signalé la nécessité de maintenir les animaux pendant au moins une heure à la température fixée pour les essais, nous avons nous-mêmes fixé à 24 heures le temps d'accoutumance des poissons à cette température.

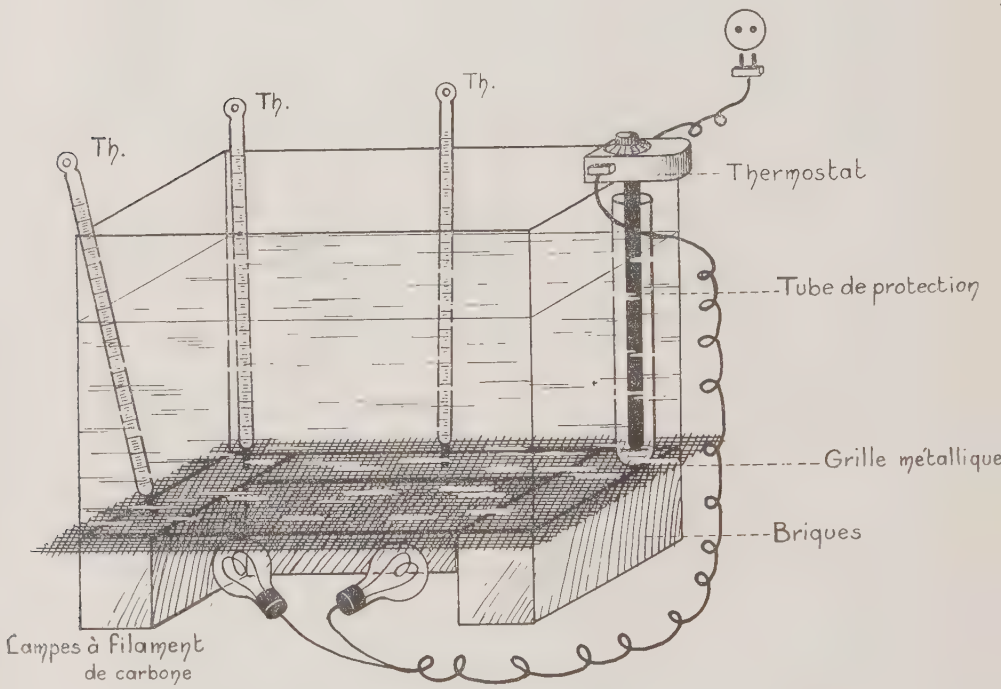


FIGURE I

Schéma du système chauffant avec régulateur.
(On a enlevé une des briques pour mettre en évidence l'installation).

Dans des cuves rectangulaires de 5 ou 10 litres, remplies avec de l'eau courante froide, on place un certain nombre de poissons : 20 à 25 dans les petites cuves, 30 à 40 dans les grandes. Ces cuves reposent sur quatre briques formant les côtés d'un rectangle. Dans l'espace resté libre entre la cuve et la paillasse émaillée, et limité par les briques, nous plaçons une ou deux lampes à filament de carbone. Ces lampes sont reliées à une prise de courant, et un ther-

mostat dont la tige trempe dans l'eau de la cuve est intercalé sur l'un des fils. Les lampes chauffent lentement et progressivement l'eau de la cuve où les poissons assurent eux-mêmes une agitation continuelle. Lorsque la température désirée est atteinte, les lampes s'éteignent ; elles se rallument si la température vient à baisser.

Afin d'éviter une trop grande intensité lumineuse dans la cuve, nous avons intercalé entre les lampes et le fond de celle-ci, une grille métallique à mailles serrées, qui servait en outre à la bonne répartition de la chaleur, et plusieurs feuilles de papier filtre.

D'autre part, nous avons fait plonger la tige du thermostat, non pas directement dans l'eau de la cuve, mais dans un tube à essai de large diamètre (5 cm) rempli d'eau et dont le bord émerge légèrement au-dessus du niveau de l'eau dans la cuve. Nous évitons par cette précaution, les inconvénients maintes fois signalés dus à la présence d'objets métalliques dans l'eau où vivent les poissons. En outre, nous nous sommes toujours assurés de l'égalité de température entre les différents points de la cuve grâce à plusieurs thermomètres. L'eau est donc de cette manière amenée progressivement à la température fixée, et les poissons sont ainsi accoutumés à cette température que nous avons toujours maintenue 24 heures avant d'entreprendre nos essais.

D'autre part, nous avons veillé à ce que la solution anesthésique soit effectuée exactement à cette même température, et y soit maintenue en plongeant les récipients d'expérience dans les cuves de 5 et 10 litres précédemment décrites, pendant toute la durée de l'expérience.

Lorsque nous avons entrepris des essais à des températures inférieures à celle du laboratoire, soit à 10 et 5 degrés, l'abaissement a été obtenu en plaçant dans de grandes cuves remplies d'eau, refroidie par addition, en plus ou moins grande quantité, de glace fondue ou de glace, des cuves plus petites (forme conserve) contenant environ 2 litres d'eau et 10 poissons au maximum. Les cuves externes

étaient entourées de plusieurs couches de coton cardé, fournissant un isolement thermique suffisant, le tout étant placé dans une pièce particulièrement fraîche. Nous avons, par ce procédé, obtenu des refroidissements réguliers et nous avons pu, dans ce cas aussi, maintenir la température fixée pendant 24 heures avant d'entreprendre les essais.

b) Influence de la température sur la résistance des épinoches a l'action du chlorhydrate de cocaine. — Pour l'étude systématique de l'influence de la température sur la sensibilité des épinoches au chlorhydrate de cocaïne, nous avons utilisé des solutions anesthésiques à la concentration de 0 g. 10 pour mille, concentration qui nous avait donné, dans quelques essais préliminaires, une anesthésie en 13 minutes environ, à la température du laboratoire (14°). Dans l'eau de conduite utilisée, cette solution a un pH égal à 7,8.

Nos essais ont été entrepris aux températures de 5, 10, 14, 20 et 25 degrés, après accoutumance des poissons 24 heures à ces températures.

Appliquant la technique précédemment décrite, nous avons toujours utilisé dix poissons pour chaque essai, et les chiffres sont les moyennes des dix essais.

Nos résultats sont résumés dans le tableau III.

Nous avons pu observer en outre au cours de l'accoutumance à la température des essais, que les poissons présentent au delà de 25° toute une série de troubles. Dans une première phase, on note une certaine agitation ; puis dans un deuxième temps, on voit apparaître des troubles respiratoires et un ralentissement des mouvements dont l'énergie diminue progressivement. A cette période succède une autre phase de grande agitation, avec mouvements désordonnés, puis cette agitation diminue à nouveau, le poisson se couche sur le flanc, et s'immobilise ; la respiration persiste, mais diminue peu à peu. A 30° dans l'eau potable pure, les poissons meurent dans un état de « rigidité absolue », dans un temps compris entre deux heures et huit heures.

TABLEAU III

Influence de la température sur l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les épinoches

Eau de conduite : pH : 7,8. Concentration 0 g. 10 0/00

Température	5°	10°	14°	20°	25°
	Temps nécessaire pour obtenir l'anesthésie en min.				
	35	15	10	4	2
	37	22	11,5	4	2,5
	37	27	13,5	5,5	3
	39	29	14,5	7	3
	41	15	16	8	4
	60	18	11	9	2
	17	20	13	4	1,5
	20	20	14,5	5	2
	31	31	15	6	3
	38	34	20	12	2,5
Moyennes	35,2	23,1	13,9	6,4	2,5

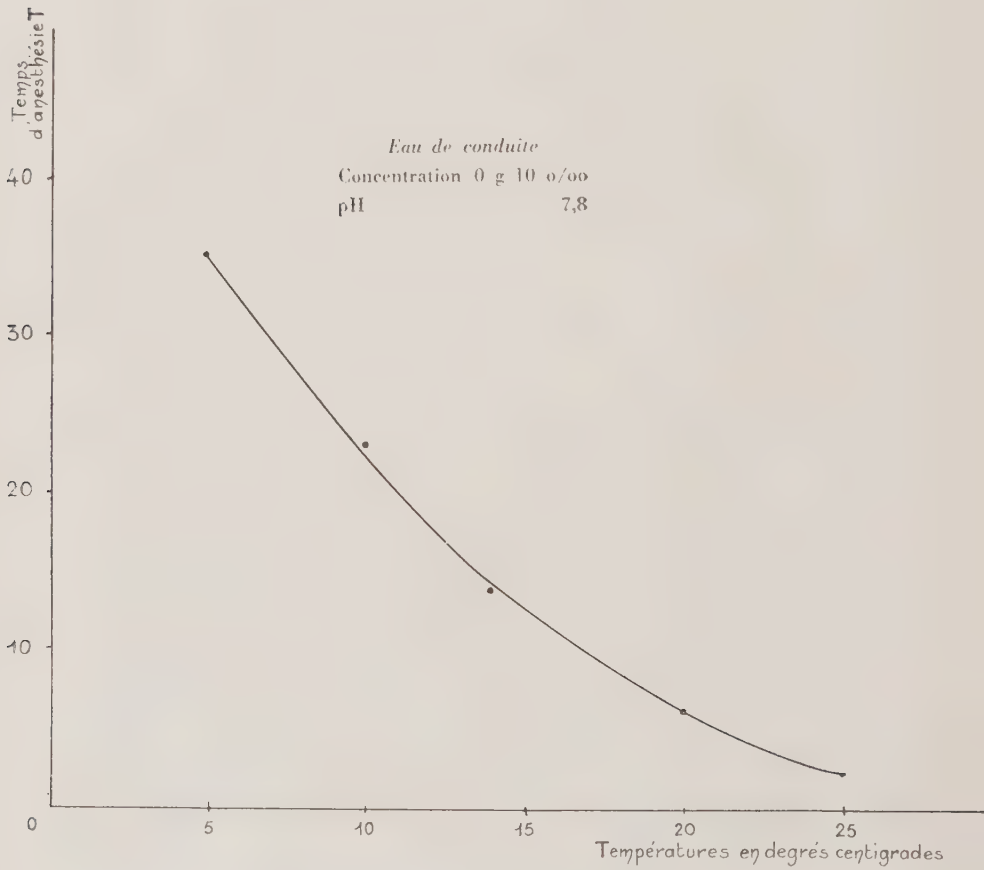
Si sur un graphique, nous portons en abscisse les températures en degrés centigrades, et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie en minute, nous obtenons la courbe suivante (courbe 1).

Nos résultats se rapportant au chlorhydrate de cocaïne viennent donc confirmer ce que de nombreux auteurs avaient déjà constaté, à savoir que l'élévation de température augmente la sensibilité des poissons à l'action de drogues les plus diverses.

Il importe donc, dans les essais ultérieurs, de veiller opérer toujours à la même température, température qui devra rester constante pendant toute la durée de chaque essai.

IX) **Influence de la réaction du milieu sur la physiologie des épinoches.** — Avant d'entreprendre des essais pour déterminer l'influence de la réaction sur la

pénétration du chlorhydrate de cocaïne, il nous a paru nécessaire d'établir quelles sont les limites d'acidité ou d'alcalinité compatibles avec la vie des épinoches, et de déterminer ainsi les pH optima, les pH inoffensifs et les pH mortels pour ces poissons.



Courbe I

Influence de la température sur l'action du chlorhydrate de cocaïne sur Gasterosteus aculeatus.

Nous avons placé six poissons dans de l'eau de conduite amenée au pH voulu par addition de solutions diluées de

soude ou d'acide chlorhydrique, et nous avons observé minutieusement leurs réactions pendant six heures, temps au bout duquel nous les avons remis dans l'eau pure.

A pH 7,8 (pH de l'eau de conduite sans addition aucune), les poissons ne manifestent évidemment aucun trouble.

Il en est de même aux pH 7,0 et 6,0 pour lesquels nous n'avons constaté aucun phénomène anormal : tous les poissons étaient encore vivants au bout de six heures.

A pH 5,0, la respiration des poissons devient saccadée au bout de deux heures environ, le rythme en est ralenti. Les animaux présentent un léger engourdissement, mais aucun poisson n'est mort en six heures.

A pH 4,0, nous avons pu observer les mêmes phénomènes, engourdissement et ralentissement du rythme respiratoire, mais nous avons noté, en outre, au bout de trois heures environ, une altération très nette de l'aspect des nageoires qui semblent nécrosées et desquament abondamment. Au bout de six heures, les nageoires paraissent réduites à leur squelette, mais aucun poisson ne meurt au bout de ce temps.

Les mêmes phénomènes plus marqués qu'à pH 4,0, sont observés à pH 3,0. Mais, dans ce cas, un poisson est mort au bout d'une heure, et les 5 autres au bout de trois heures.

A pH 2,5 l'épiderme des animaux est nettement attaqué et présente des tuméfactions et lésions multiples, aucun poisson ne survit au bout d'une heure. A pH 2,0, les phénomènes se produisent plus rapidement encore, et avec plus d'intensité et les poissons meurent tous en trente minutes.

Nous avons en outre noté au bout de 24 heures le nombre d'animaux survivant après avoir été remis dans l'eau pure. Un poisson sur les six placés à pH 7,0 ou à pH 6,0 était mort au bout de ce temps, tandis qu'il ne restait que quatre survivants pour les séries maintenues à pH 5,0 et à pH 4,0.

Dans l'échelle de l'alcalinité, nous n'avons entrepris des essais qu'à pH 8,4, pH, 9,0 et pH 9,5. Ces degrés d'alcalinité sont absolument sans action sur les poissons, en six heures.

Nous avons seulement pu noter un léger engourdissement, mais celui-ci cesse dès que l'on provoque une légère excitation mécanique (choc sur le cristallisoir ou léger coup avec un agitateur en verre), et il ne semble même pas certain que cet engourdissement soit dû à l'alcalinité des solutions.

Nous résumons dans le tableau suivant les résultats ainsi obtenus.

TABLEAU IV

Influence des ions H et des ions OH sur la physiologie de Gasterosteus aculeatus

Eau de conduite, Température 20°

pH	Nombre de poissons morts au bout de :				Observations en 6 heures
	30m.	1 h.	3 h.	6 h.	
9,5				0	Sans action nocive
9,0				0	—
8,4				0	—
7,8 (eau ordinaire)				0	—
7,0				0	—
6,0				0	—
5,0				0	Altération du rythme respiratoire
4,0				0	Altération du rythme respiratoire ; attaque des téguments.
3,0	0	1	6		Attaque des téguments ; mort.
2,5	0	6			id.
2,0	6				id.

Dans la zone des pH acides, nos résultats sont comparables à ceux de G.M.F. Cassaigne qui a trouvé, pour des poissons d'espèces différentes, placés dans de l'eau de source, des pH mortels de 3,2 pour les cyprinides, et 2,9 pour les poissons rouges. Dans ses travaux, cet auteur

avait signalé le pH 10,5 comme mortel pour les poissons essayés, dans l'eau de conduite ; nous n'avons pas cherché, pour notre part, à atteindre une aussi grande alcalinité qui provoque la précipitation de la base cocaïne, et ne présente donc aucun intérêt pour nos essais personnels.

Notons aussi que nos conclusions sont analogues à celles de Lopez-Lomba qui a constaté que dans une zone comprise entre pH 4,5 et pH 9,5, l'acidité ou l'alcalinité des solutions est sans action nocive pour les poissons.

N) **Influence de la réaction du milieu sur la sensibilité des épinoches au chlorydrate de cocaïne.** — Il sera donc possible en opérant dans la zone des pH inoffensifs pour les poissons, de déterminer l'influence de la réaction des solutions sur la sensibilité des épinoches au chlorhydrate de cocaïne, sans avoir à tenir compte de l'influence propre de l'acidité ou de l'alcalinité.

Pour ces essais, nous avons cependant toujours eu soin d'opérer comparativement avec des témoins placés dans de l'eau de conduite, amenée aux mêmes pH que les solutions anesthésiques.

Nous avons choisi la même concentration que pour établir la courbe des températures, soit 0 g. 10 pour mille, et fixé à 20° la température de nos essais, température qui nous permet d'obtenir dans les conditions normales une anesthésie en environ 6 minutes à la concentration considérée. Les conditions de volume des solutions et de forme des récipients sont toujours celles que nous avons décrites. On utilise toujours 10 animaux pour chaque essai, et les résultats sont la moyenne des chiffres obtenus.

Nous avons amené les solutions aux pH voulus par addition de solutions normales d'acide chlorhydrique et de soude.

Nos résultats sont résumés dans le tableau V.

A pH 6,0 et à pH 5,0, les réflexes n'ont pas disparu au bout de deux heures.

TABLEAU V

Influence de la concentration en ions H des solutions sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne.

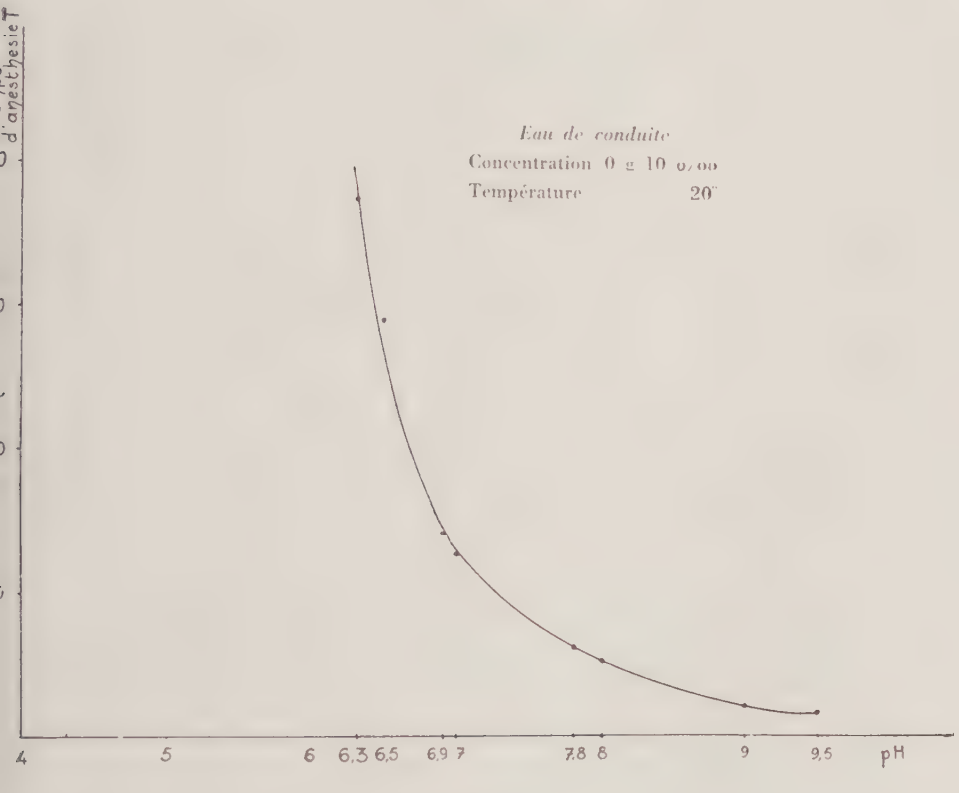
Eau de conduite — Température 20°
Concentration 0 g. 10 0/00.

pH	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)							
	9,5	9,0	8,0	7,8	7,0	6,8	6,5	6,3
	1	1,5	4,5	4	9	9	28	25
	1	1,5	5	4	7,5	13	32	26
	1,5	2	6	5,5	12	13,5	36	41
	2	3	6	7	14	15	36	50
	2,5	5	6,5	8	15	17,5	39	55
	1,5	1	5	9	10,5	18	19	25
	1,5	1,5	5	4	13	11	21	30
	1,5	1,5	5,5	5	14,5	10	27	30
	2	2,5	6	6	15	17	24	44
	2	4	7	12	16	18	28	50
Moyennes	1,7	2,4	5,3	6,4	12,5	14,2	29	37,6

Nous voyons, à l'examen de ce tableau qu'un déplacement de la réaction vers l'alcalinité favorise l'action du chlorhydrate de cocaïne, et que par contre, l'acidité est nettement défavorable à son activité.

Nous pouvons constater en outre, que les temps nécessaires à l'anesthésie ne sont pas inversement proportionnels au pH. Ces temps augmentent dans des proportions bien plus grandes lorsque l'on se trouve dans l'échelle des pH acides que dans la zone alcaline. Nous voyons en effet que les temps d'anesthésie sont 2 fois plus grands pour le pH 8,0 que pour le pH 9,0 ; 2,35 fois plus grands pour le pH 7,0 que pour le pH 8,0 : et qu'ils augmentent dans la même proportion pour passer seulement du pH 7,0 au pH 6,5. Ils atteignent enfin une valeur que nous ne pouvons mesurer, mais qui est bien plus de 4 fois supérieure, pour passer seulement de pH 6,5 à pH 6,0, à la concentration considérée.

On fera la même constatation en examinant la courbe obtenue en portant en abscisse les concentrations en ions hydrogène, et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie, en minutes. (courbe II).



COURBE II

Influence de la concentration en ions H des solutions sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour Gasterosteus aculeatus.

Nous avons répété ces essais avec une solution plus concentrée, soit 0 g. 50 pour mille.

Nos résultats sont résumés dans le tableau VI.

A pH 4,0 et à pH 5,0 on n'a pas obtenu la disparition de la réponse réflexe au bout de 2 heures.

TABLEAU VI

Influence de la concentration en ions H des solutions sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne.

Eau de conduite. Concentration : 0 g, 50 pour mille
Température 20°

pH	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en min.)			
	7,8	7,0	6,0	5,5
	1,5	2,5	3	22
	1,5	4	7	26
	2	4	6	32
	2	4,5	8,5	33
	2,5	5	11	38
	1	2	4	43
	2	4	6	45
	1	4,5	7	46
	2	4,5	10	48
	1,5	4,5	10,5	50
Moyennes	1,7	3,9	7,3	38,3

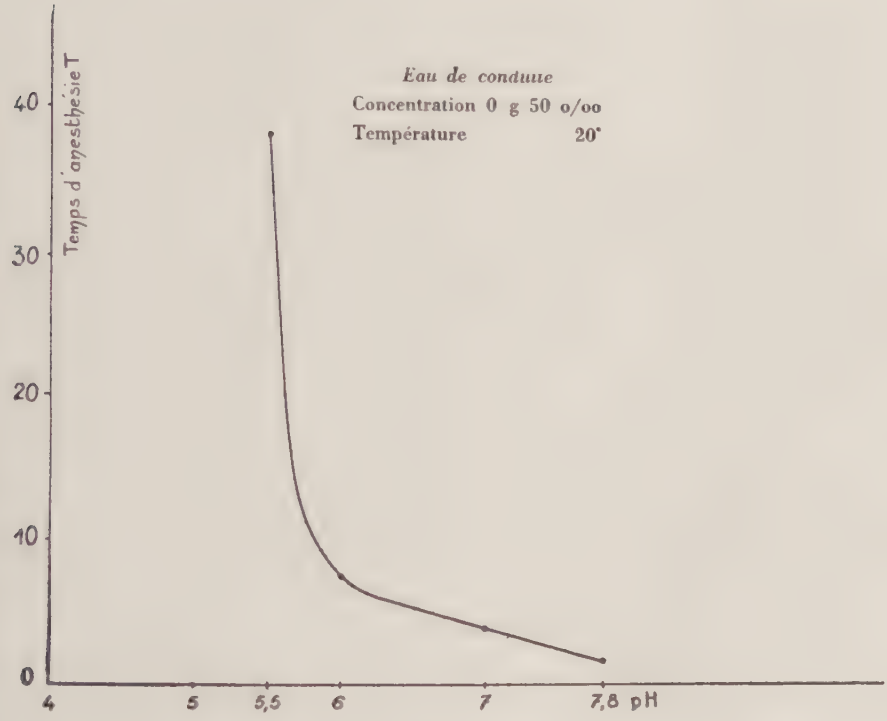
A cette concentration de 0 g. 50 pour mille, le rapport du temps nécessaire pour obtenir l'anesthésie à pH 6,0 au temps nécessaire à pH 7.0 est environ de deux. Ce rapport est supérieur à cinq pour les pH 5,5 et 6,0 et indéfini pour les pH 5,0 et 5,5.

Ces résultats ont servi à construire la courbe suivante qui montre nettement l'influence de la réaction des solutions sur le temps nécessaire à la perte du réflexe test. (courbe III)

Pour mettre en évidence plus nettement encore l'influence défavorable de l'acidité, nous avons cherché les concentrations permettant d'obtenir la disparition des réflexes en des temps compris entre 20 et 25 minutes.

Par interpolation des courbes précédentes, nous voyons qu'il faut des concentrations de 0 g. 10 pour mille à pH 6,7 et de 0 g. 50 pour mille à pH 5,7 pour obtenir une anesthésie en 20 minutes. Pour les pH plus acides, pH 5,0 et pH 4,0,

nous avons procédé par tâtonnements sur des séries de cinq poissons, et nous avons trouvé qu'il fallait 4 g. pour mille à pH 5,0 et 7 g. 50 pour mille à pH 4,0 pour obtenir à peu près le même résultat.



COURBE III

Influence de la concentration en ions H des solutions sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour Gasterosteus aculeatus.

La moyenne des temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie est en effet de 21,6 minutes à pH 5,0 pour une concentration de 4 g. pour mille, et de 23,8 minutes à pH 4,0 pour une concentration de 7 g. 5 pour mille.

Nous voyons donc que pour obtenir à peu près les mêmes actions anesthésiques, lorsque le pH varie, il faut modifier les concentrations de façon considérable, dans des proportions de 1 à 5 quand on passe de pH 6,7 à pH 5,7 :

de 1 à 40 quand on passe de pH 6,7 à pH 5,0 et de 1 à 75 quand on passe de pH 6,7 à pH 4,0.

Le pouvoir anesthésique du chlorhydrate de cocaïne est donc beaucoup plus grand pour les poissons lorsque les solutions sont alcalines que lorsqu'elles sont acides. Nos résultats viennent confirmer, une fois de plus, ceux déjà obtenus par J. Régnier et ses collaborateurs en utilisant de nombreuses autres techniques.

Nous avons vu dans la majorité des travaux qui utilisent les poissons comme réactif biologique pour l'essai de produits divers que, pour une concentration déterminée de drogue, le maximum d'action était obtenu avec des solutions alcalines. D'après certains auteurs, l'alcalinité provoquerait la diminution de la viscosité de la mucine, et la pénétration à travers l'épithélium branchial serait ainsi grandement facilitée.

Il est possible que nous ayons, dans nos essais, une superposition de deux phénomènes qui agiraient dans le même sens : d'une part l'alcalinisation du milieu facilite la pénétration des substances dissoutes à travers l'épithélium branchial, d'autre part, les cellules réceptrices sont plus sensibles à l'action de l'anesthésique présenté en solution alcaline.

Il sera donc important de veiller, dans nos essais ultérieurs, à procéder comme pour la température, à des pH identiques et constants pendant toute la durée des essais.

XI) **Etude des variations du pouvoir anesthésique du chlorhydrate de cocaïne en fonction de la concentration.** — Les conditions expérimentales ont été identiques à celles précédemment décrites. Les solutions ont été préparées dans de l'eau de conduite, au même pH 7,8 que cette eau, pH obtenu sans qu'il ait été nécessaire d'ajuster les solutions. La température a été maintenue à 20°, les poissons ayant été accoutumés 24 heures à cette température.

Nos résultats sont groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU VII

Influence de la concentration sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour les épinoches.

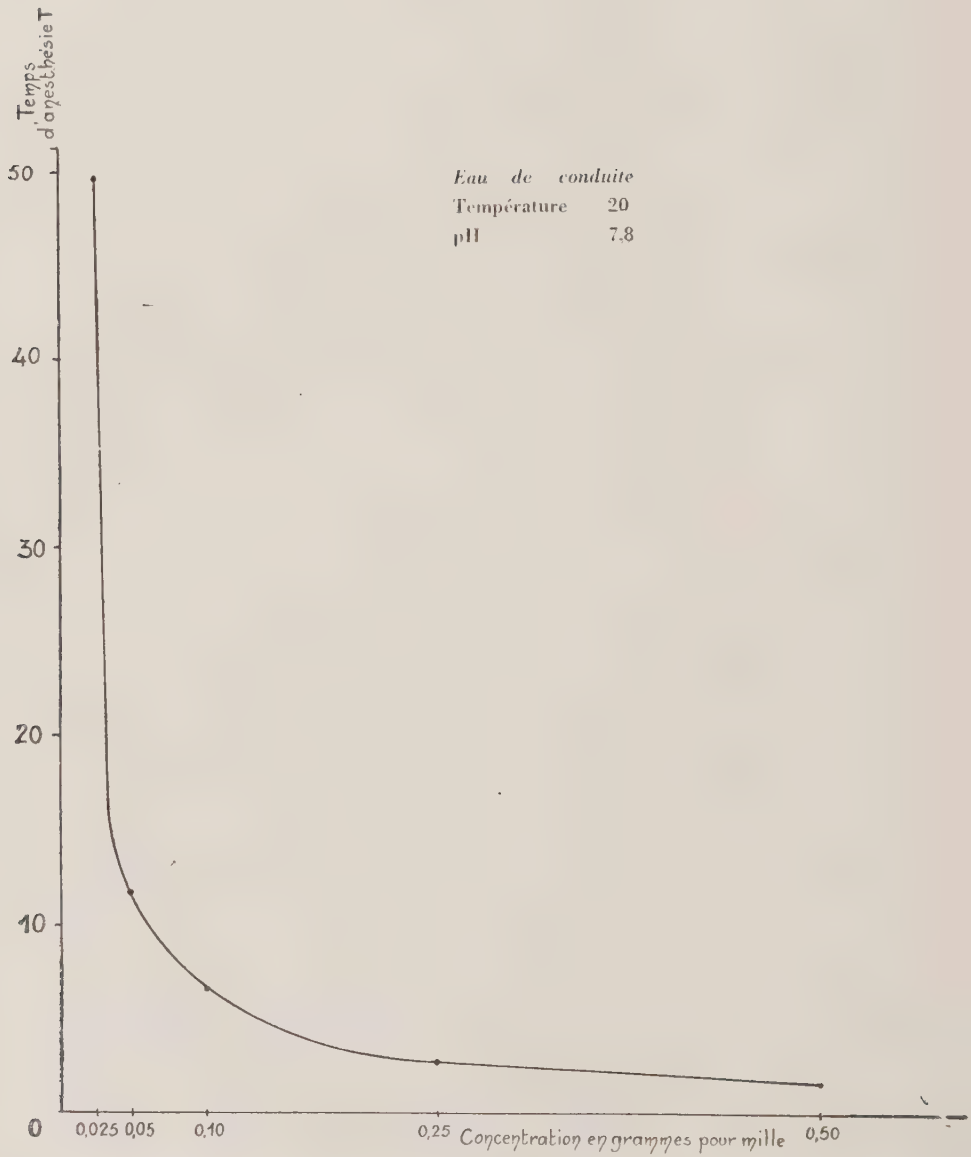
Eau de conduite, Température 20°, pH : 7,8

Concentration en grammes p. mille	Temps nécessaires p. obtenir l'anesthésie (en min.)				
	0,025	0,05	0,10	0,25	0,50
	30	6	4	2,5	1,5
	34	9	4	2,5	1,5
	61	10	5,5	2,5	2
	65	11	7	2,5	2
	67	12	8	3	2,5
	67	12	9	2	1
	69	14	4	5	2
	29	14	5	3,5	1
	35	14,5	6	3	2
	40	15	12	2	1,5
Moyennes	49,7	11,7	6,4	2,8	1,7

Si nous considérons les valeurs de ce tableau, nous constatons que les temps nécessaires pour obtenir la disparition des réflexes diminuent lorsque la concentration augmente, mais que ces temps ne sont pas inversement proportionnels à la concentration.

Aux fortes concentrations, la diminution des temps d'anesthésie est moins rapide que l'augmentation des titres des solutions. Ce fait apparaît nettement si l'on trace la courbe « temps d'action-concentration », en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie. (courbe IV).

XII) **Limite des essais.** Afin d'obtenir des déterminations exactes, il nous a paru nécessaire de fixer les limites maxima et minima de temps entre lesquelles, d'une part les poissons présentent le moins de variations



COURBE IV

Influence de la concentration sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour Gasterosteus aculeatus.

individuelles, d'autre part l'erreur sur l'observation du test est la plus petite par rapport au temps global.

En considérant que les différences de temps, qui sont très faibles en valeur absolue aux fortes concentrations, augmentent aux faibles concentrations, et qu'il existe une zone dans laquelle une faible variation des taux de cocaïne correspond à des différences de temps de survie très grandes, nous avons fixé comme limite de la zone des temps utilisables pour nos essais, un temps minimum de 0,5 minute, et un temps maximum de 120 minutes ; limites au delà desquelles les chiffres obtenus perdent leur précision. Aux très fortes concentrations, l'erreur relative risque en effet d'être importante en raison de la difficulté de noter les résultats avec une grande précision.

Nos conclusions confirment donc les observations analogues faites par Pittenger et Vanderkleed, Adams et Gersdorff.

XIII. **Influence de la nature de l'eau sur l'activité du chlorydrate de cocaïne pour les épinoches.** Comme nous l'avons vu plus haut, l'eau distillée présente une certaine toxicité pour les épinoches, mais cette action nocive ne se manifeste qu'au bout de six à sept heures au minimum. Ayant fixé à deux heures la limite de nos essais, il nous a paru possible de faire une étude comparative de l'action du chlorhydrate de cocaïne, à diverses concentrations, dans l'eau de conduite d'une part et dans l'eau distillée d'autre part.

J. Lévy et R. Hamet ayant attribué aux variations de pH les différences des résultats qu'ils obtenaient avec l'eau de conduite et avec l'eau distillée, nous avons eu soin d'effectuer nos essais en amenant au même pH toutes les solutions.

Nous avons été conduits à choisir un pH légèrement acide, les premiers essais effectués dans de l'eau distillée ajustée à pH 7,8 ayant donné des résultats incohérents. Nous avons pu en effet observer que la présence des pois-

sons tend à ramener à la neutralité ces solutions non tamponnées. A pH 6,5, au contraire, le pH reste constant, malgré le séjour prolongé des poissons.

L'eau distillée que nous avons utilisée avait un pH de 5,0 ou de 6,0 selon sa provenance. Cette eau était ajustée à pH 6,5 par addition de 3 à 8 centimètres cubes de soude N/10 par litre. La dissolution du sel de cocaïne, aux concentrations essayées ne modifiait pas la réaction de l'eau ainsi ajustée.

Nos résultats ont été les suivants :

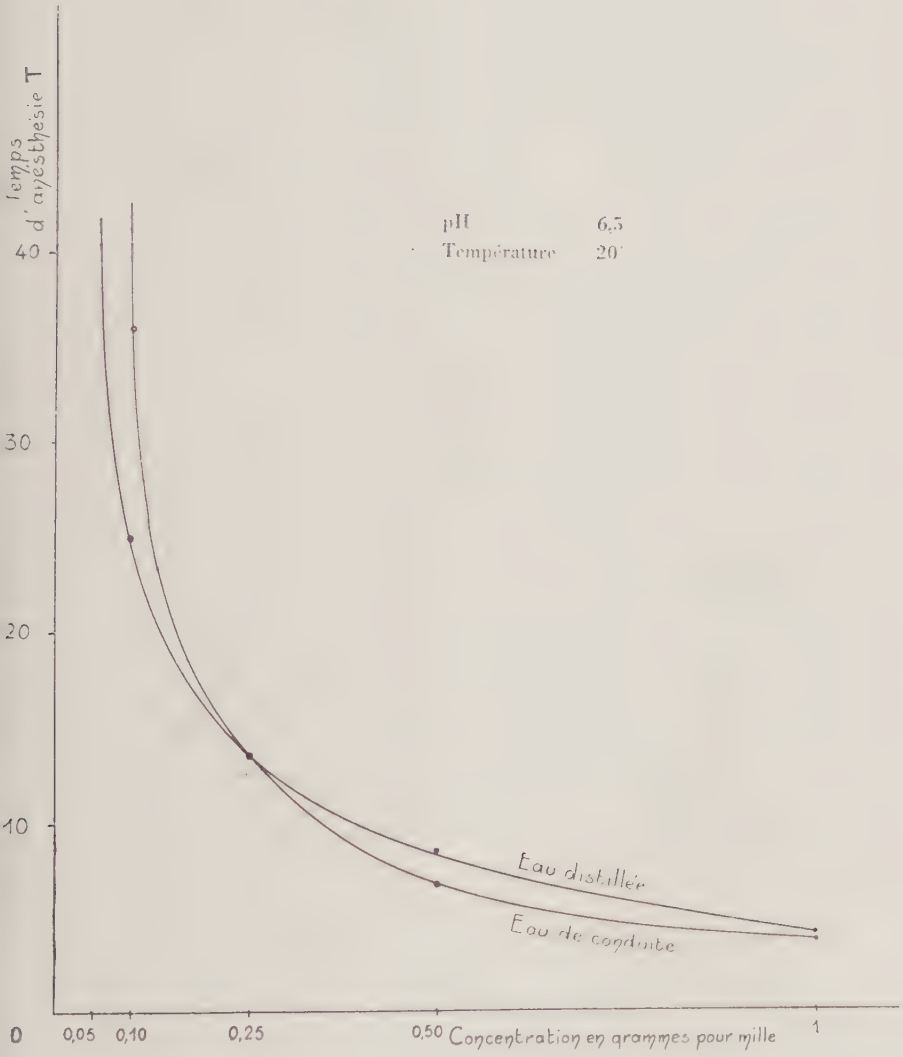
TABLEAU VIII

Influence de la nature de l'eau sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour les épinoches.

Moyennes de 10 essais. pH : 6,5. Température : 20°

Concentration en grammes pour mille	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes).	
	Eau de conduite	Eau distillée
1	3,9	4,2
0,50	6,7	8,5
0,25	13,3	13,3
0,10	36,1	25,2
0,05	plus de 120	plus de 120

En examinant ces chiffres, et les courbes tracées en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (courbes V) nous pouvons observer que, aux fortes concentrations, l'eau distillée semble diminuer légèrement l'action de la cocaïne. Aux faibles concentrations, l'anesthésique paraît être au contraire un peu plus actif dans l'eau distillée. Mais les différences ainsi obtenues sont très faibles, et il apparaît que, si l'on se place dans les mêmes conditions de pH et de température, la nature de l'eau a une influence négligeable sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour les poissons.



COURBES V

Influence de la nature de l'eau sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour Gasterosteus aculeatus.

En résumé, nos essais nous conduisent aux conclusions suivantes :

1°) Les épinoches ne peuvent supporter sans inconvénient les changements brusques de température. La température maxima compatible avec la vie des poissons est 25°.

2°) Une élévation de la température favorise la pénétration du chlorhydrate de cocaïne et augmente probablement la sensibilité des cellules nerveuses des poissons à l'action de cet anesthésique.

3°) Les poissons supportent sans inconvénients notables les modifications de la réaction du milieu dans lequel ils sont placés, si le pH ne dépasse pas les valeurs limites de pH 4,0 et pH 9,5.

4°) Un déplacement de la réaction vers l'alcalinité augmente considérablement le pouvoir anesthésique du chlorhydrate de cocaïne sur *Gasterosteus aculeatus*.

L'acidité est par contre nettement défavorable à l'action de cet anesthésique.

5°) La nature de l'eau ne modifie pas d'une manière sensible l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les épinoches, si l'on a soin d'amener à un même pH les solutions effectuées avec de l'eau de conduite et avec de l'eau distillée.

Ces différents résultats nous conduisent à résumer ainsi la technique que nous avons été amenés à adopter et que nous utiliserons pour tous nos essais.

Les poissons prélevés dans de grands bacs à eau courante sont placés dans des cuves en verre remplies d'eau, à la même température que les bacs, et que l'on amène progressivement à la température fixée pour les essais, soit par un système chauffant avec régulateur, soit au contraire par un dispositif de réfrigération. Les cuves sont alors maintenues pendant 24 heures à cette température dans le but « d'accoutumer » les poissons.

Les animaux sont placés au moment de l'essai dans des vases à précipitation chaude, forme basse, d'une capa-

cité de 600 centimètres cubes contenant 300 centimètres cubes de solution anesthésique, et maintenus d'une manière constante à la température fixée pour l'essai.

Le pH des solutions est vérifié, et l'on s'assure qu'il reste constant pendant toute la durée de l'essai.

Des poissons préparés de la même façon sont placés dans de l'eau de conduite, à la même température et au même pH, et servent de témoins.

On note les phénomènes qui apparaissent progressivement, et l'on détermine, à l'aide d'une petite pince non piquante le moment où l'animal ne répond plus par un mouvement réflexe brusque à un pincement des nageoires caudale et dorsale. Ce temps T sera considéré comme « temps d'anesthésie » ou « temps de narcose ».

On utilise pour chaque mesure dix animaux et les résultats représentent la moyenne des temps obtenus pour les dix essais.

On ne tient compte que des temps compris entre les limites inférieure et supérieure de 0,5 minute et 120 minutes, limites au delà desquelles la mesure perd sa précision.

Les poissons sont alors retirés de la solution anesthésique, mesurés rapidement, et placés dans des cuves de deux litres d'eau de conduite où l'on pourra les observer et noter les temps de survie ou le pourcentage de mortalité.

CHAPITRE III

ACTION DE DIFFÉRENTS SELS DE PARAAMINOBENZOYLDIETHYLAMINOETHANOL SUR GASTEROSTEUS ACULEATUS

Les essais qui vont être décrits ont eu pour but de déterminer dans quelles conditions les différents facteurs que nous avons considérés : température, réaction, concentration, modifient l'activité des sels du paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, base de la novocaïne pour *Gasterosteus aculeatus*, et surtout de vérifier dans quelle mesure l'acide qui salifie la base intervient dans l'activité de ces anesthésiques.

De rapides essais préliminaires nous ont amenés à des conclusions analogues à celles que nous avons trouvées pour le chlorhydrate de cocaïne en ce qui concerne l'influence de l'espèce, de la taille et du poids des poissons. Comme pour le sel de cocaïne, les épinochettes sont plus résistantes que les épinoches à l'action du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, et l'on ne peut noter un rapport régulier entre le poids et la taille des animaux et la durée nécessaire pour obtenir la narcose.

I) Influence de la température sur l'activité de quelques sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

1°) Chlorhydrate de paraaminobenzoyldiétylaminoéthanol. — Nous avons utilisé pour nos essais la « Scurocaïne », novocaïne officinale (chl. de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol : C13 H20 N2 O2, ClH, P.M. 272,5) qui nous a été fournie par la maison Rhône-Poulenc.

Quelques essais préliminaires nous ont permis de fixer la concentration de cet anesthésique qui, à la température de 20°, provoque l'anesthésie dans un temps favorable pour la technique que nous utilisons. Cette concentration est de 0 g. 50 pour mille, ce qui correspond à une solution M/545, contenant 0 g. 433 de base pour mille.

Les phénomènes que nous avons pu observer en immergeant des épinoches dans une solution de novocaïne officinale sont en tous points semblables à ceux décrits avec le chlorhydrate de cocaïne ; mêmes symptômes d'agitation, de perte d'équilibre et de torpeur, sans plus de régularité et de constance dans l'apparition de ces phénomènes. La disparition de la réponse réflexe au pincement des nageoires caudale et dorsale présente elle aussi les mêmes caractères de netteté si on opère dans les limites de temps que nous avons précisées pour le chlorhydrate de cocaïne, sans que l'on puisse observer une plus grande sensibilité de l'une des deux nageoires. Les conditions expérimentales seront donc identiques à celles que nous avons décrites pour nos premiers essais.

Nous avons pu observer cependant une augmentation de l'intensité de pigmentation des téguments, seul phénomène qui diffère de ceux provoqués chez les épinoches par le chlorhydrate de cocaïne dont l'action se manifestait au contraire par une très nette décoloration de l'épiderme.

Nos expériences, entreprises à différentes températures, comme pour le chlorhydrate de cocaïne, nous ont fourni les résultats suivants :

TABLEAU IX

Influence de la température sur l'activité du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiétylaminoéthanol pour les épinoches.

Eau de conduite. Concentration : 0 g. 50 pour mille. pH. : 7,8.

Température	Temps nécess. pour obtenir l'anesthésie (en minut.)				
	5°	10°	15°	20°	25°
	72	37	9,5	8	3
	73	37	19	8	3
	75	39	19	8,5	3,7
	80	40	21	8,5	3,2
	82	41	22	9,5	2,5
	84	43	29	11	4
	85	44	20	5	3,5
	88	44	21	7,5	4
	90	48	22	9	2
	100	48	28,5	13	2,7
Moyenne :	82,9	42,2	21,2	8,8	3,0

2°) Phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. — Nous avons utilisé pour nos essais un sel cristallisé de l'acide phénylpropionique ($C_6H_5 - CH_2 - CH_2 - COOH$; P. M. 160) qui nous a été fourni par l'usine de produits chimiques de Laire. Qu'il nous soit permis de remercier ici M. Delange qui, en nous procurant ce sel, ainsi que le citrate de la même base et les acides phénylpropionique et gluconique, a facilité la poursuite de nos recherches.

Des essais analogues à ceux que nous venons de décrire nous ont montré que l'action du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur les épinoches se manifeste d'une manière identique à celle du chlorhydrate correspondant ou du chlorhydrate de cocaïne. Nous n'avons observé aucun phénomène particulier imputable à ce sel de « novocaïne », exception faite pour l'augmentation d'in-

tensité de la pigmentation que nous retrouverons pour tous les sels de cette base.

Nous avons choisi la même concentration moléculaire que pour le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, soit M 545, ce qui correspond à une solution contenant 0 g. 708 de phénylpropionate de cette base pour mille. Les essais sont toujours effectués dans de l'eau de conduite ; le pH 7,8 étant obtenu ici par simple addition de 4 gouttes par litre au maximum, d'une solution normale de soude, aux solutions de sel anesthésique.

Nos résultats sont les suivants :

TABLEAU X

Influence de la température sur l'activité du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour les épinoches.

Eau de conduite. Concentration : M/545 soit 0 g. 708 pour mille
pH (ajusté) : 7,8

	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)				
Température :	5°	10°	15°	20°	25°
	73	25	13	4,2	3,5
	73	31	13,7	4,5	3,5
	75	32	15,7	4,7	4
	76	33	16,5	5	4
	79	35,5	17,5	5,5	3,2
	80	36	18,5	6	3,7
	92	38,5	19,2	4,5	3,7
	92	39	21	5	3,7
	94	41	22,5	5,5	2,5
	100	42	25	6	4
Moyenne :	83,4	35,3	18,2	5,1	3,6

3°) Citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. - Nous avons utilisé le sel bibasique, cristallisé, de l'acide citrique ($COOH\text{-}CH_2 - C(COOH)(OH) - CH_2\text{-}COOH$: P. M. 192)

qui, comme le phénylpropionate, nous a été fourni par les Usines de LAIRE.

Ce sel provoque chez les épinoches les mêmes symptômes que ceux que nous avons décrits pour les autres sels de la même base. Nous avons utilisé des solutions à une concentration moléculaire équivalente en base à celle employée par le chlorhydrate et le phénylpropionate, soit M 545 de base, ce qui correspond, le citrate employé étant bibasique, à M (545 × 2) de sel, soit 0 g. 6255 pour mille.

Comme pour les autres sels, les essais ont été effectués dans de l'eau de conduite, le pH 7.8 étant obtenu dans ce cas par addition de XIII gouttes par litre de soude normale.

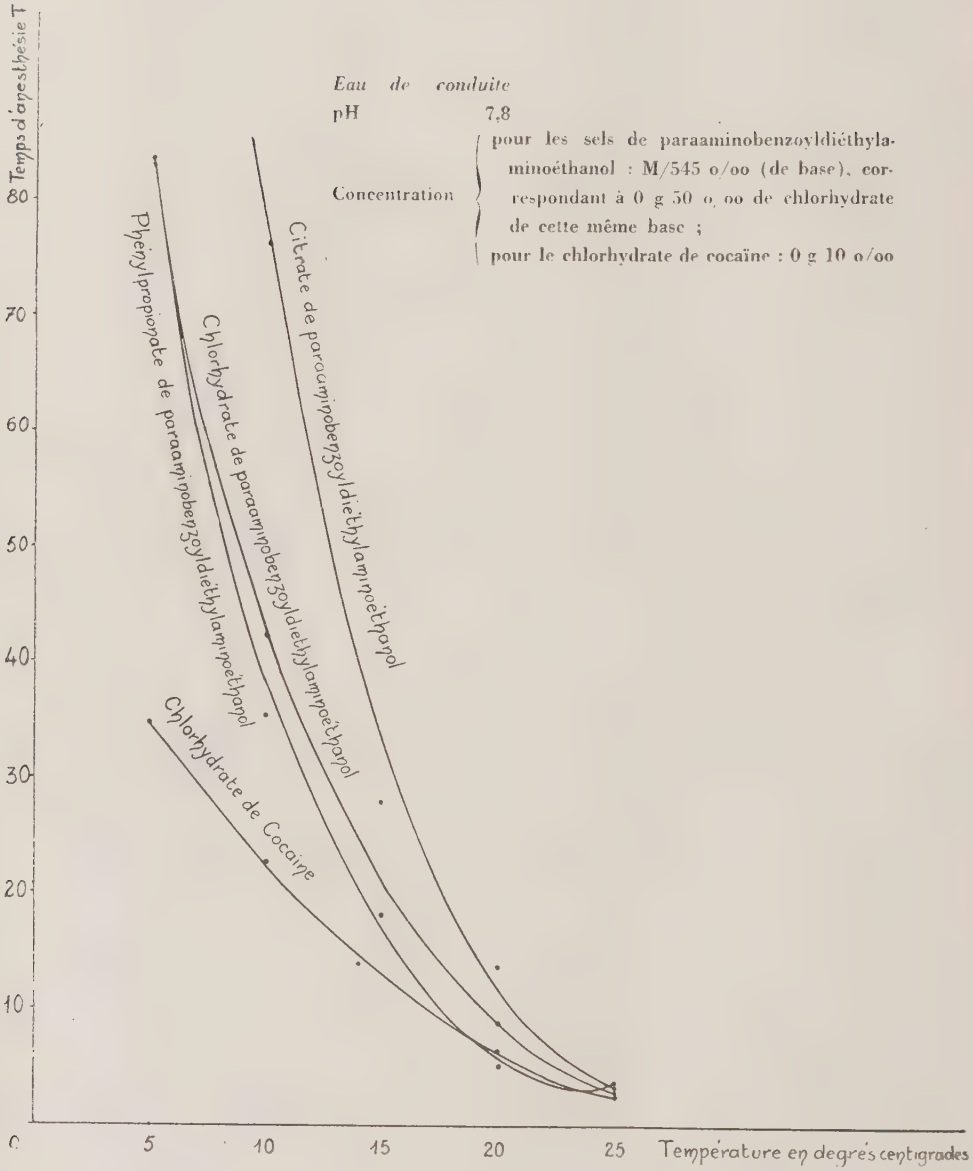
Nous résumons dans le tableau suivant les moyennes des temps nécessaires pour obtenir la disparition du réflexe test, en fonction de la température.

TABLEAU XI

Influence de la température sur l'activité du citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour les épinoches.

Eau de conduite. Concentration : M/(545 × 2) soit 0 g. 625 pour mille
pH (ajusté) : 7,8

Température :	Temp nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)				
	5°	10°	15°	20°	25°
	82	55	22,5	10,5	3
	97	68	23	11	3,2
	98	69	25	11,5	3,7
	100	75	26	12,7	1,5
	100	75	27,5	12,7	2,2
	pl. de 120'	85	29	14	3
	id.	85	30,5	16	3,5
	id.	85	30,5	16,2	3,5
	id.	88	32	17	4
	id.	épinochette	32	17	4,5
Moyenne :	pl. de 120	76,1	27,8	13,8	3,2



COURBES VI

Influence de la température sur l'activité de différents sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour Gasterosteus aculeatus. Comparaison avec le chlorhydrate de cocaïne.

L'influence de l'élévation de la température sur l'activité, pour les épinoches, de ces sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol apparaît plus clairement encore, si, comme nous l'avons fait pour le chlorhydrate de cocaïne, nous examinons les courbes obtenues en portant en abscisse les températures, et en ordonnée les temps nécessaires pour la disparition du réflexe test.

Afin de faciliter la comparaison avec le chlorhydrate de cocaïne, nous avons ajouté sur le graphique la courbe obtenue antérieurement avec cet anesthésique. (courbes VI).

En comparant ces différents tracés, nous observons que l'élévation de température des solutions favorise leur action, mais que l'influence de ce facteur se fait plus fortement sentir sur l'activité des sels de novocaïne que sur celle du chlorhydrate de cocaïne.

C'est ainsi qu'en passant de 20° à 10° les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie sont multipliés par 6,9 pour le phénylpropionate, par 5,5 pour le citrate, par 4,8 pour le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, alors qu'ils ne le sont que par 3,6 pour le chlorhydrate de cocaïne.

II) Influence de la réaction sur l'activité du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Nous avons déterminé l'action de la concentration en ions H des solutions sur le pouvoir anesthésique de la « novocaïne » officinale, comme nous l'avons fait précédemment pour le chlorhydrate de cocaïne.

Nous avons opéré dans les mêmes conditions expérimentales, à la température de 20°, avec des solutions à la concentration M 545 de sel pour mille, et nous avons veillé à opérer dans les limites de pH non toxiques pour les épinoches, limites que nous avons déjà précisées.

Les solutions ont été, comme dans tous nos essais, amenées au pH voulus par addition de quantités variables d'acide chlorhydrique ou de soude, soit, par litre, 8 cm³

d'acide chlorhydrique N/1 pour le pH le plus acide, et 2 cm³ de soude N/1 pour le pH le plus alcalin.

Le tableau qui suit résume nos résultats.

TABLEAU XII

Influence de la réaction sur l'activité du chlorydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour les épinoches.

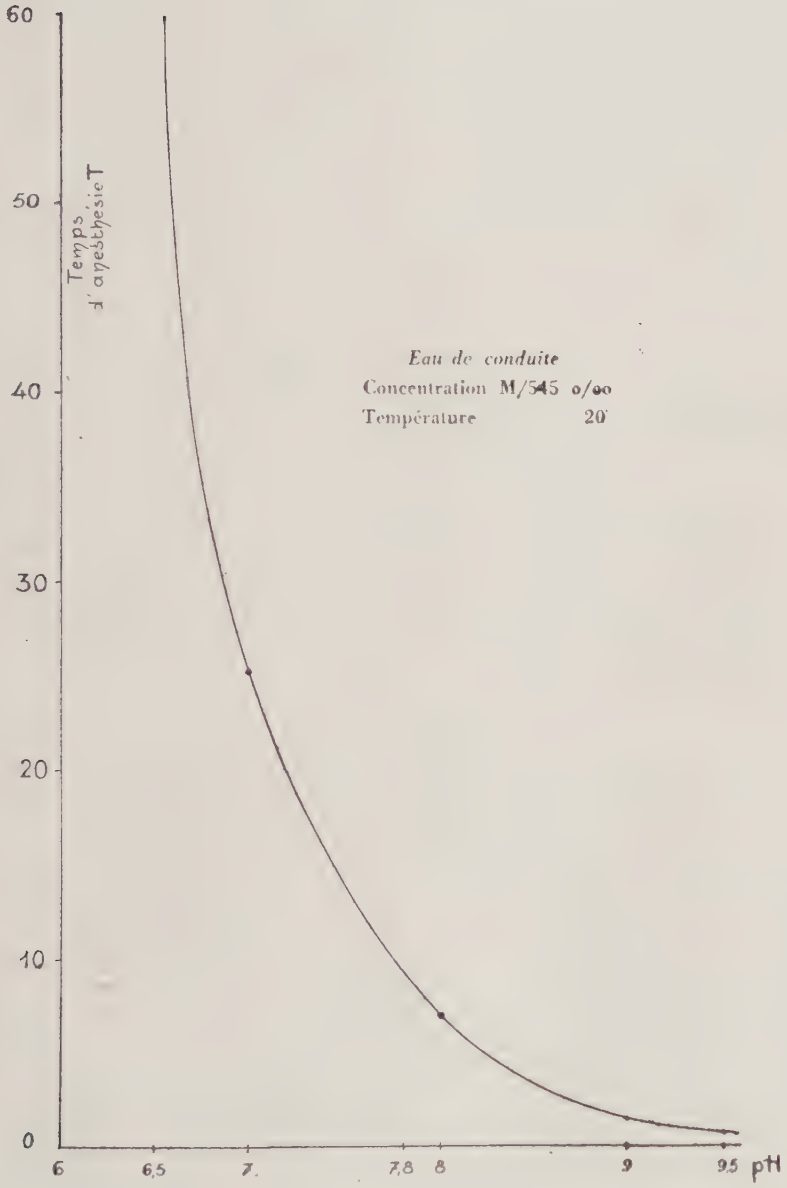
Eau de conduite. Concentration : M/545 soit 0 g. 50 pour mille
Température : 20°

	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)					
pH	9,5	9,0	7,8	7,0	6,5	6,0
	0,8	1,5	8	22	105	93
	0,9	1,5	8	23	112	116
	1	1	8,5	23,5	120	pl. de 120
	0,6	2	8,5	25,5	pl. de 120	id.
	0,6	1	9,5	26,5	id.	id.
	0,8	1,5	11	29	id.	id.
	0,8	1	5	21	id.	id.
	1	1,8	7,5	22,5	id.	id.
	0,8	1,5	9	27	id.	id.
	0,8	1,8	13	32	id.	id.
Moyen. ;	0,8	1,4	8,8	25,2	pl. d. 120	pl. de. 120

Comme pour tous nos essais précédents, nous avons traduit nos résultats par la courbe « concentration en ions H — temps d'anesthésie ». (courbe VII).

Nous obtenons, comme pour le chlorhydrate de cocaïne, une courbe d'allure hyperbolique. Son examen nous permet de voir qu'un déplacement vers l'acidité a une action très défavorable sur l'activité de l'anesthésique, et que dans ce cas, comme dans celui de la cocaïne, les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie ne sont pas inversement proportionnels à la concentration en ions H.

Ces résultats concordent avec les observations antérieures de divers auteurs concernant la pénétration des



COURBE VII

Influence de la réaction des solutions sur l'activité de la « novocaïne officinale ».

drogues à travers l'épithélium branchial des poissons en fonction de la concentration en ions H des solutions, et viennent confirmer les conclusions de J. RÉGNIER et de ses collaborateurs sur l'influence de l'acidité ou de l'alcalinité sur la sensibilité des organismes à l'action de tous ces sels anesthésiques. Ils nous ont paru suffisamment concluants pour juger inutile de reprendre les mêmes essais avec les autres sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

III) Étude de l'action comparative du chlorhydrate de cocaïne et du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Avant d'examiner l'activité de différents sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, nous avons étudié comparativement l'action du chlorhydrate de cocaïne et de la « novocaïne » officinale sur les épinoches. Les essais, poursuivis simultanément pour les deux sels, nous ont conduits aux résultats suivants.

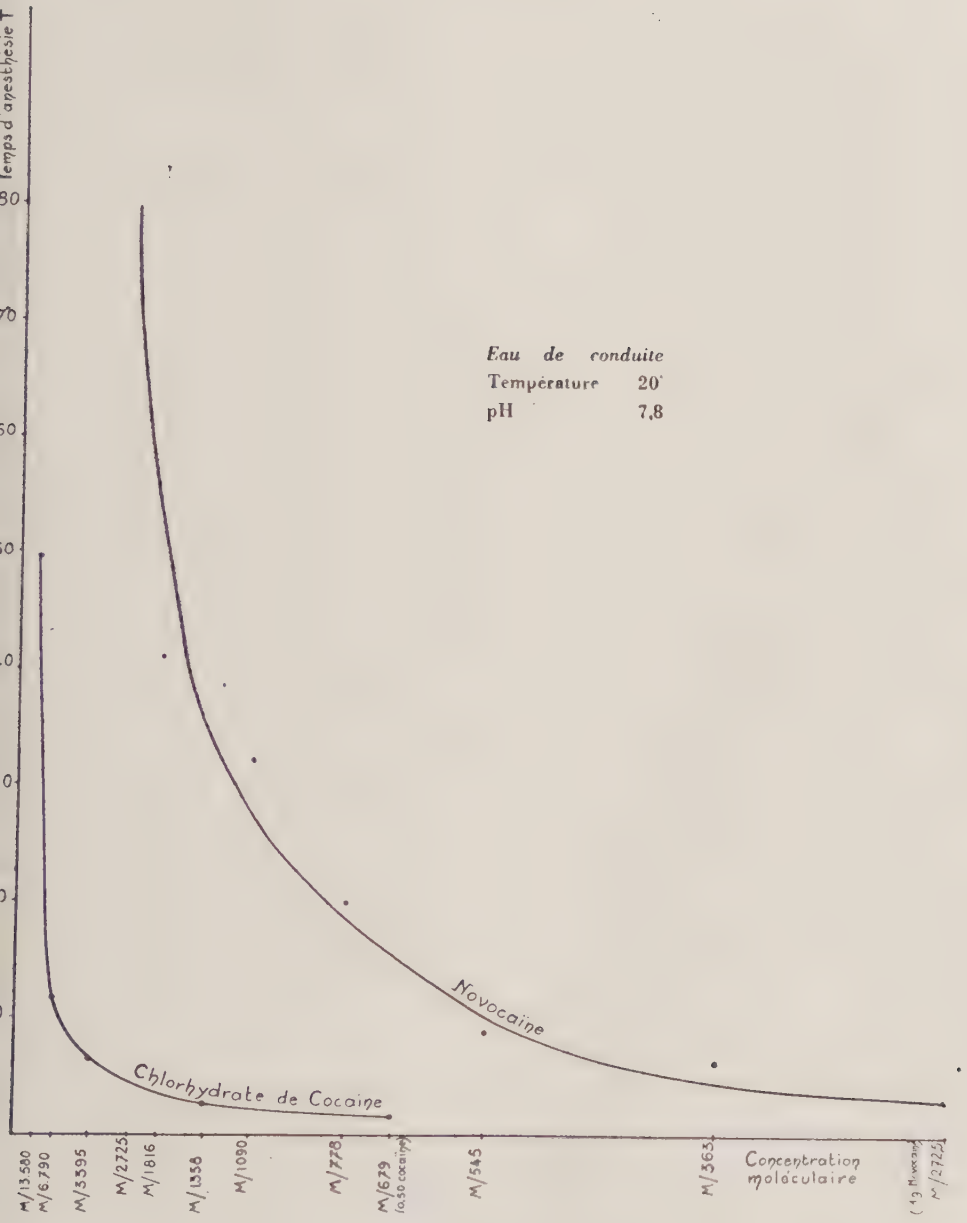
TABLEAU XIII

Etude comparative de l'activité du chlorhydrate de cocaïne et du chlorhydrate de paraabenzoyldiéthylaminoéthanol.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Chlorhydrate de cocaïne			Chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol		
Concent. en g °/oo	Concentration moléculaire	T	Concent. en g. °/oo	Concentration moléculaire	T
0,025	M/13.580	49,7	0,10	M/2.725	115,3
0,05	M/ 6.790	11,7	0,15	M/1.816	41
0,10	M/ 3.395	6,4	0,25	M/1.090	32,1
0,25	M/ 1.358	2,8	0,35	M/ 778	19,8
0,50	M/ 679	1,7	0,50	M/ 545	8,8
			0,75	M/ 363	6,2
			1	M/ 272,5	2,9

T = Temps nécessaire pour obtenir l'anesthésie (en minutes).



COURBES VIII

Courbes : « temps d'action-concentration moléculaire » pour le **chlorhydrate de cocaïne et la « novocaïne ».**

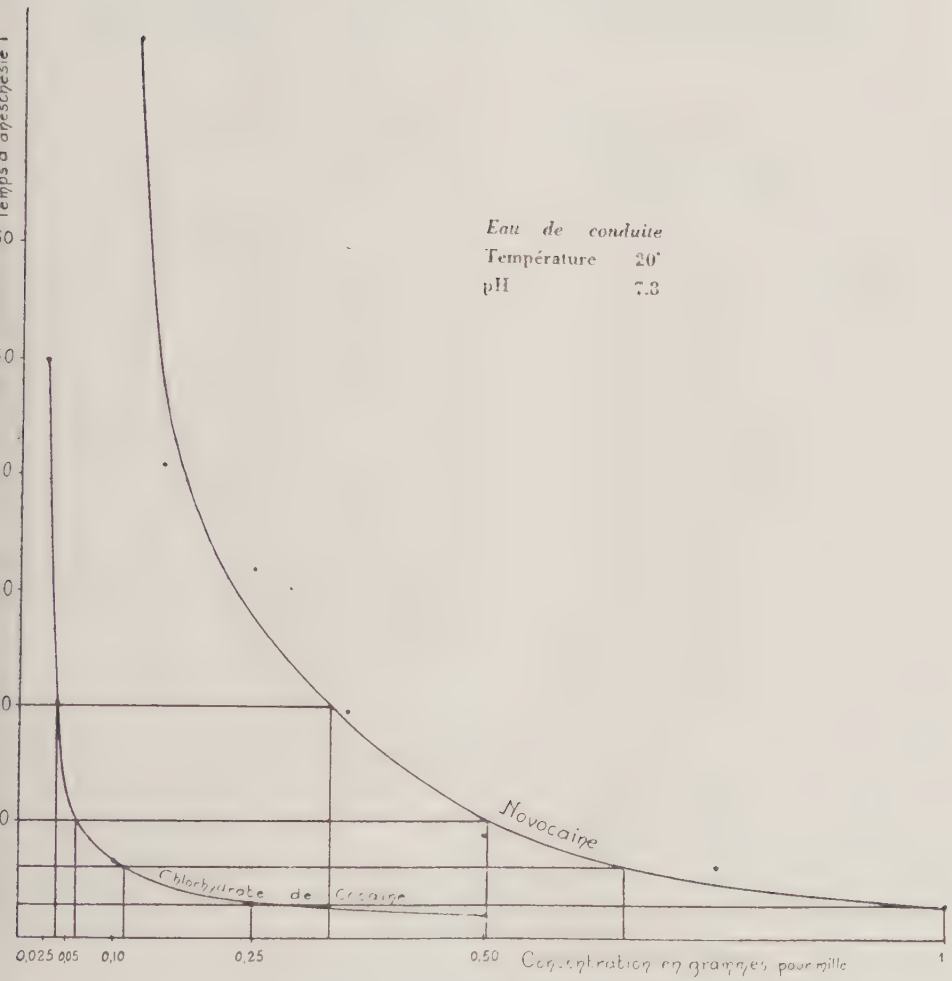
Ces chiffres nous ont d'abord permis de construire les courbes suivantes (courbe VIII), obtenues en portant en abscisse les concentrations et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie.

L'examen de ces courbes nous montre que l'activité des deux anesthésiques ne varie pas parallèlement avec les concentrations.

Pour obtenir l'anesthésie en trois, six, dix ou vingt minutes, il faut employer : pour le chlorhydrate de cocaïne des concentrations sensiblement égales à 0,25 ; 0,11 ; 0,060 et 0,037 grammes pour mille, et pour le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, des solutions à : 1 ; 0,65 ; 0,505 et 0,33 grammes pour mille. Le rapport dose de novocaïne/dose de chlorhydrate de cocaïne croît donc régulièrement de 4 à 9 quand le temps nécessaire à l'anesthésie passe de trois à vingt minutes. L'activité « relative » des solutions de novocaïne diminue donc d'autant plus que ces solutions sont moins concentrées.

Si, dans la construction de nos courbes, nous remplaçons les poids d'anesthésiques employés par les concentrations moléculaires correspondantes, les deux graphiques se trouvent légèrement déplacés l'un par rapport à l'autre (courbe IX). Si nous considérons alors les temps d'anesthésie les plus faibles obtenus avec le chlorhydrate de cocaïne, nous constatons que, pour des concentrations moléculaires respectivement égales à M/679, M/778, M/1090 les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie sont d'environ : 1,7 ; 1,9 et 2,5 minutes pour le chlorhydrate de cocaïne et de 15 ; 19,8 et 32,1 minutes pour la novocaïne. Les rapports successifs entre ces deux séries de chiffres étant égaux à 8,8 ; 10 et 12,8, nous pouvons dire que, pour cette portion de la courbe la plus facile à interpréter, et à concentration moléculaire égale, la novocaïne est de neuf à treize fois moins active que la cocaïne.

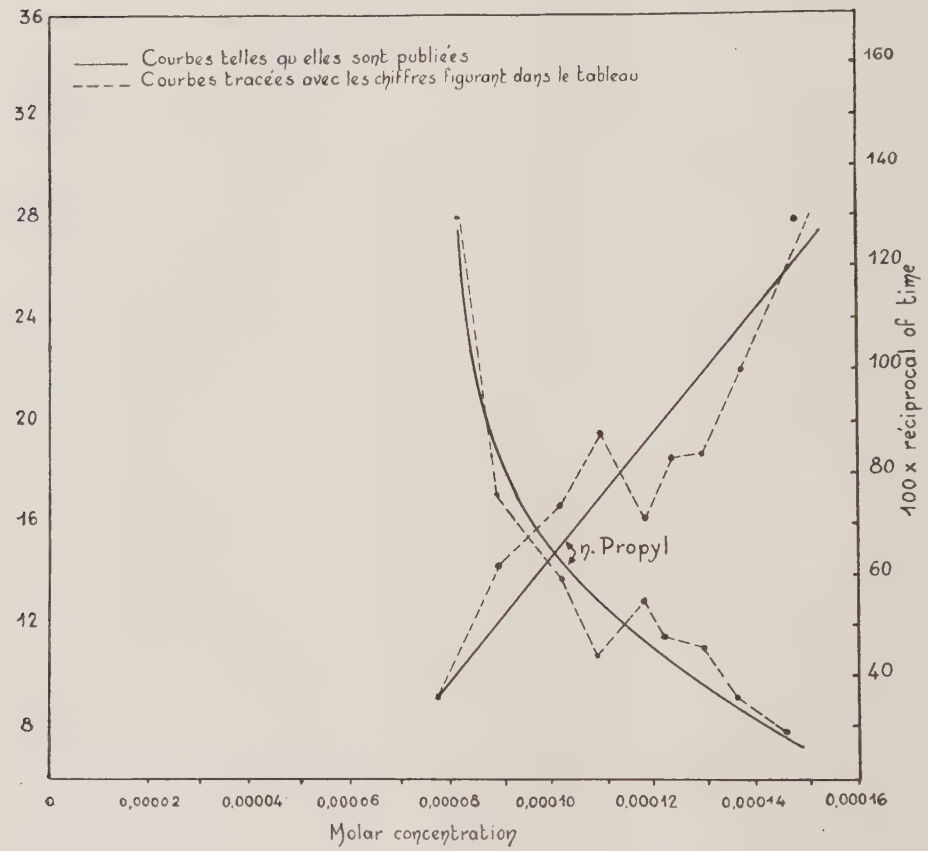
Un autre procédé d'évaluation consiste à utiliser les « courbes inverses » préconisées par Ed. B. Powers. Nous avons vu que cet auteur, pour pouvoir comparer plus fa-



COURBES IX

Etude comparative de l'activité du chlorhydrate de cocaïne et de la « novocaïne » pour Gasterosteus aculeatus.

cilement l'action de différents toxiques sur les poissons, avait été amené à construire des courbes inverses, en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée les réciproques des temps de survie 1/T, ces rapports étant multipliés par 100 pour faciliter l'expression des résultats.

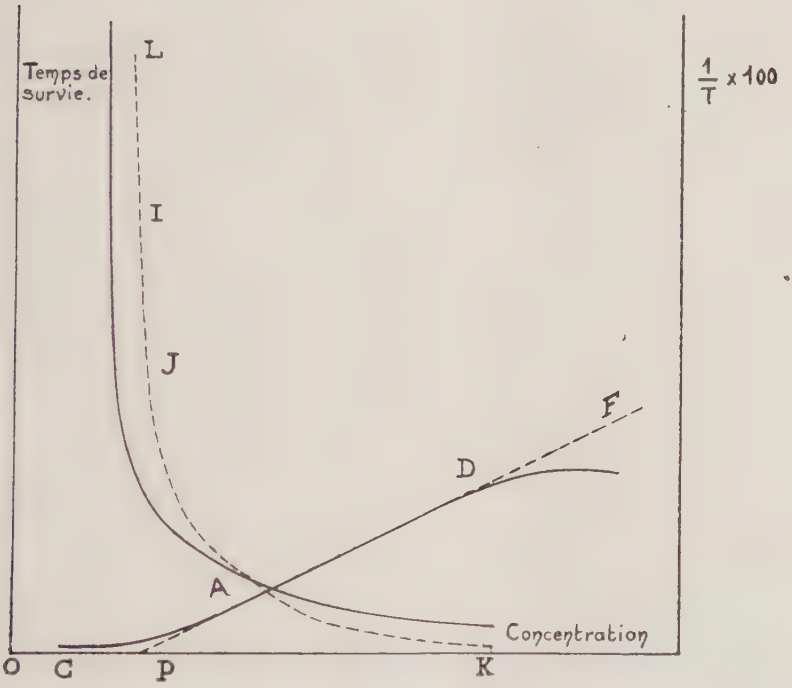


Courbes de R. Adams et ses collaborateurs.

Dans ces conditions, Powers obtient des courbes dont la pente, d'abord assez faible, augmente aux concentrations moyennes, puis diminue aux fortes concentrations. La partie médiane des courbes est une ligne droite dont le prolongement coupe l'axe des x en un point « a ». La con-

centration « a » correspondant à ce point d'intersection représente le seuil théorique de toxicité, et la valeur toxique d'un produit est représentée par le rapport entre la racine carrée de la pente θ de la droite et la concentration minimum toxique.

$$\text{valeur toxique} = \frac{\sqrt{\text{tg. } \theta}}{a}$$



Courbes de Ed. B. Powers : { Action du chlorure de lithium sur les poissons.

C = seuil réel de concentration de toxicité

P = seuil théorique

PO = « a° »

Courbe PADF : rapidité de mort théorique (velocity of fatality).

— HIJK : hyperbole équilatère tracée par calcul = courbe théorique des temps de survie.

Pour une valeur égale de « a », un produit sera d'autant plus actif que la pente de la courbe sera plus grande.

Ce mode de représentation a été repris, en particulier, par R. ADAMS et ses collaborateurs en remplaçant le temps de survie par le temps nécessaire pour obtenir l'anesthésie.

Nous avons appliqué ces données à l'étude du chlorhydrate de cocaïne et du chlorhydrate de parasaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. Le tableau XIV donne, en fonction des concentrations, l'inverse des temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (tableau XIV), et les chiffres ainsi obtenus ont été utilisés pour construire les courbes correspondantes (courbes X).

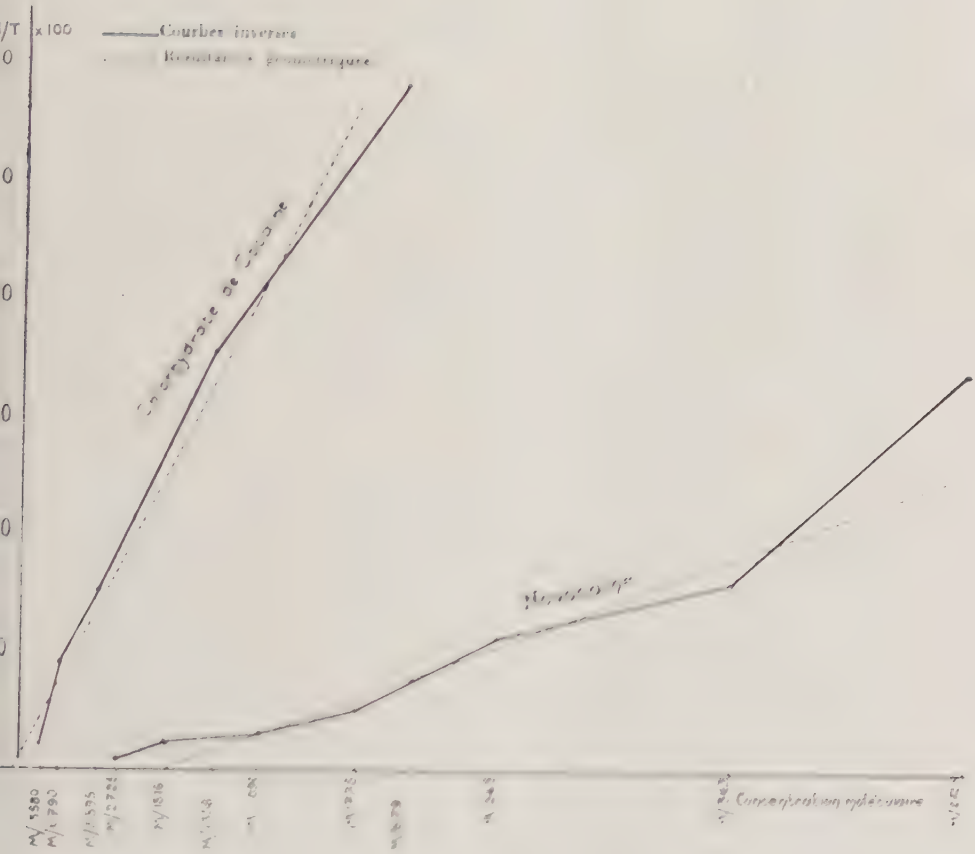
TABLEAU XIV

Détermination des réciproques des temps nécessaires pour l'anesthésie : 1 /T × 100.

Taux de survivants : Température : 20° pH : 7,8

Cocaïne				Novocaïne			
Concentration		T	1 /T × 100	Concentration		T	1 /T × 100
en gr. p. 1 000	moléculaire			en gr. p. 1 000	moléculaire		
0,025	M/ 13,38	46,7	2	0,30	M/ 2,725	115,8	0,8
0,05	M/ 6,730	11,7	8,5	0,15	M/ 4,876	41	2,4
0,10	M/ 3,365	6,4	15,6	0,25	M/ 1,000	20,1	5,1
0,25	M/ 1,358	2,8	35,7	1,50	M/ 678	10,8	9
0,50	M/ 679	1,7	58,8	2,50	M/ 543	8,8	11,3
				0,75	M/ 360	6,2	16,1
				1	M/ 272,5	5,4	18,4

Les courbes ainsi obtenues paraissent moins régulières que celles qui sont décrites par Ed. B. Towns et par R. ADAMS, mais, si l'on se reporte aux publications de ces auteurs, on constate que les graphiques tracés dans leurs mémoires représentent simplement des schémas théoriques satisfaisant à la moyenne des résultats trouvés.



Courbes X

Etude comparative de l'activité du chlorhydrate de cocaïne et de la « novocaïne » pour Gasterosteus aculeatus.

« Courbes inverses » des courbes VIII.

« Concentration moléculaire — Réciproque des temps d'anesthésie (× 100) ».

Si nous examinons par exemple les courbes tracées par ADAMS et ses collaborateurs concernant l'action du para-aminobenzoate de propyle normal, représentées plus haut, nous voyons que ces courbes sont des résultantes théoriques de celles que l'on obtiendrait avec les chiffres figurant dans leurs tableaux. Le seuil d'anesthésie « a » a donc, lui aussi, une valeur théorique.

Nous pouvons faire des remarques similaires, en ce qui concerne les courbes de POWERS. Cet auteur a en effet signalé qu'il obtenait pour les différents toxiques des « courbes inverses » CADF dont seule la portion AD est une ligne droite. La courbe théorique PADF de « rapidité de mort » ne correspond donc pas à l'hyperbole réelle, mais à une hyperbole théorique HIJK tracée avec des chiffres de valeur calculée. Dans ce cas aussi, le seuil de toxicité « a » a une valeur théorique.

En ce qui concerne nos propres essais, nos « courbes inverses » ont été tracées avec les valeurs réelles figurant dans les tableaux. Il apparaît difficile de déterminer à partir de ces tracés, et d'après la technique des auteurs américains, le point « a «, seuil théorique d'anesthésie. En effet, si la courbe inverse se rapportant au chlorhydrate de cocaïne présente trois points en ligne droite, correspondant à la portion sensible de l'hyperbole des temps d'anesthésie et se rapproche des courbes de POWERS, celle correspondant à la novocaïne ne présente pas une aussi grande régularité et il est difficile de déterminer, dans ce cas, quelle est la portion du tracé qui correspond à la région sensible de l'hyperbole des temps d'anesthésie. Si même, en ce qui concerne le chlorhydrate de cocaïne, nous cherchons à déterminer le point « a » d'après la technique des auteurs américains, nous voyons que le seuil théorique d'anesthésie aurait ainsi une valeur négative. Il apparaît donc nettement que nos essais ne nous fournissent pas suffisamment de points, sur chaque tracé, pour pouvoir appliquer la méthode d'expression de POWERS et ADAMS.

Nous avons nous-mêmes cherché à évaluer un « seuil théorique d'action » en traçant les résultantes géométriques de nos courbes inverses. Ces résultantes, qui figurent en traits interrompus sur nos graphiques, représenteraient une action résultante théorique des sels anesthésiques sur les poissons. Anticipant sur les résultats que nous relaterons ultérieurement, nous voyons que, dans ce cas aussi, « a », point d'intersection des « résultantes d'action », et de l'axe des x, représentant le « seuil théorique d'action » peut varier d'un essai à l'autre, ce qui peut s'expliquer, comme nous l'avons déjà vu, par l'influence de divers facteurs tels que saison, frai, provenance des animaux, etc. Nous verrons en effet que, le seuil théorique d'anesthésie « a » de la novocaïne peut avoir, pour des essais effectués dans des conditions similaires, mais non simultanément, des valeurs respectives de 0,15, 0,07, 0,16 ou même dans un cas, être négatif. Mais il est évident aussi que le fait de faire intervenir dans l'établissement de ces résultantes d'action, les portions des courbes inverses correspondant aux régions assymptotiques des hyperboles d'anesthésie, apporte une cause d'erreur dans la détermination du seuil d'action théorique. Cependant, il semble bien que, si une détermination mathématique se montre difficile, ces résultantes d'action représentent l'activité globale des substances anesthésiques pour les poissons, à toutes les concentrations, et la comparaison des différentes activités de plusieurs anesthésiques pourra se faire par le simple examen de l'inclinaison de ces « résultantes d'action » par rapport à l'axe des x.

Si l'établissement de ces résultantes n'apparaît pas indispensable, dans le cas de la comparaison du chlorhydrate de cocaïne et de la novocaïne, l'inclinaison des courbes inverses étant suffisamment nette, nous verrons plus loin que ces résultantes faciliteront grandement la lecture des résultats sur les graphiques correspondant à plusieurs substances anesthésiques.

L'examen des chiffres obtenus et de nos courbes montre nettement que, pour la « novocaïne » comme pour le chlo-

rhydrate de cocaïne, les temps nécessaires pour obtenir la disparition des réflexes diminuent quand la concentration augmente, mais que ces temps ne sont pas inversement proportionnels à la concentration. Aux fortes concentrations, la diminution des temps d'anesthésie est moins rapide que l'augmentation du titre des solutions, phénomène que nous retrouverons pour tous les anesthésiques étudiés. Nos courbes présentent toutes, comme celles des auteurs américains concernant les paraaminobenzoates d'alcoyl, l'allure d'une hyperbole.

Il nous semble cependant intéressant de signaler que, dans une publication très récente, H. Scheiner [138-139] a trouvé, dans une étude de l'action narcotique de la novocaïne sur les poissons, des résultats sensiblement différents.

Cet auteur a évalué l'intensité de l'action narcotique par la vitesse de l'arrêt respiratoire qui en est la manifestation ultime. Il a mesuré le temps qui s'écoule entre le moment de l'immersion de l'animal et l'arrêt respiratoire, c'est-à-dire « l'arrêt de l'ouverture et de la fermeture des branchies ». Ses résultats ont amené H. Scheiner à conclure que la rapidité d'installation de l'effet narcotique est en relation directe avec la concentration, du moins pour les dilutions allant de 1 /1.000 et 1 /5.000, la courbe obtenue en portant en abscisse les concentrations et en ordonnée les vitesses de l'arrêt respiratoire étant une ligne droite pour les concentrations de 1 /1.000 à 1 /5.000, et présentant «pour les concentrations plus faibles une déviation due à l'intervention de fixations non narcotiques mais toxiques en dehors du système nerveux central. » Cet auteur a même ultérieurement envisagé la possibilité d'utiliser le caractère de proportionnalité entre la vitesse de l'arrêt respiratoire et la concentration des solutions en substance anesthésique pour le titrage biologique des solutions de novocaïne.

Il est possible que la non concordance entre nos résultats et ceux de H. Scheiner puisse s'expliquer par le fait que nous n'avons pas utilisé le même critère pour évaluer les

effets narcotiques de la novocaïne sur les poissons. Cependant il serait intéressant de savoir quelle serait l'allure de la courbe si l'on déterminait les vitesses de narcose à des concentrations supérieures et inférieures à celles considérées par l'auteur.

IV) Influence de l'acide salifiant la base sur l'activité de sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Les travaux de J. Régnier ont mis en évidence le rôle joué par l'acide salifiant la base dans l'activité anesthésique des sels de cocaïne et de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. Des différences ont ainsi été constatées sur la cornée du lapin, sur les nerfs moteurs et sensitifs de *Rana esculenta*, sur les cellules *d'Ascoïdea rubescens* et *d'Elodea canadensis*. Nous nous sommes proposés de vérifier si l'on retrouve des différences analogues lorsque l'on opère sur des organismes tels que les poissons.

Nos essais ont porté sur les chlorhydrate, phénylpropionate, citrate et gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Cependant, avant d'effectuer nos mesures, nous nous sommes assurés que les acides ainsi employés n'étaient pas toxiques pour les épinoches, dans les limites de temps de nos expériences.

1°) Action des sels de sodium des acides : chlorhydrique, phénylpropionique, citrique et gluconique sur les épinoches. (1)

Des poissons ont été immergés dans des solutions des sels de sodium des acides considérés, à des concentrations moléculaires équivalentes en base à celles des sels anesthésiques qui seront utilisées pour les essais comparatifs d'anesthésie, et à des concentrations deux fois et demi plus fortes.

---

(1) L'Acide gluconique a pour formule :
CH2OH — (CHOH) 4 — COOH P. M. 196.

Si le sel de sodium est dépourvu de toute toxicité à de telles concentrations, on doit pouvoir admettre que l'on ne devra pas imputer au radical acide une éventuelle toxicité des sels anesthésiques.

Ces essais ont été effectués dans de l'eau de conduite et dans de l'eau distillée.

Eau de conduite. — Cinq poissons, accoutumés pendant 24 heures à la température de 20° ont été placés, à cette même température, dans deux litres de solution des sels de sodium considérés. A l'exception du chlorure de sodium qui a été employé cristallisé, ces solutions ont été obtenues par addition à l'eau de conduite, de quantités déterminées des acides considérés et de proportions correspondantes de soude titrée. Cette dissolution n'a, dans aucun cas, fait varier le pH de l'eau, qui a pour valeur 7,8, et il n'a pas été nécessaire d'ajuster les solutions.

Les poissons ont été observés minutieusement et on a noté avec soin tous les symptômes anormaux pouvant révéler le caractère toxique des solutions.

Nos résultats ont été réunis dans les tableaux XV.

(Dans ces tableaux l'équivalence moléculaire correspondant à une équivalence en base, il est nécessaire de faire remarquer que M ne représente pas le poids moléculaire du sel de sodium, mais la molécule de base. Ceci concerne particulièrement le citrate utilisé, sel bibasique, pour lequel une molécule de base correspond à une demi molécule de sel de sodium).

De l'examen de ces résultats, nous pouvons conclure que, en solution dans l'eau de conduite, à pH 7,8, ces sels de sodium sont dépourvus de toxicité en huit heures pour les épinoches, à des concentrations moléculaires équivalentes en base, et même deux fois et demi plus fortes que celles des sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol que nous nous proposons d'étudier.

Eau distillée. — La durée nécessaire pour obtenir l'action narcotique étant très grande avec des solutions dont la concentration en ions H est trop élevée, nous avons

TABLEAU XV

Action des sels de sodium en solution dans l'eau de conduite, des acides chlorhydrique, phénylpropionique, citrique et gluconique, sur Gasterosteus aculeatus.

Température : 20°. pH : 7,8

Concentration moléculaire en base pour mille	Concentration des sels en g. °/oo	Observations
	Chlorure de sodium	
M /545	0,106	Aucun trouble en 8 h.
M /272,5	0,212	id.
M /109	0,53	id.
	Phénylpropionate de sodium	
M /545	0,308	Aucun trouble en 8 h.
M /272,5	0,616	id.
M /109	1,54	id.
	Citrate de sodium	
M /545	0,216	Aucun trouble en 8 h.
M /272,5	0,432	id.
M /109	1,08	id.
	Gluconate de sodium	
M /545	0,4	Aucun trouble en 8 h.
M /272,5	0,8	id.
M /109	2	id.

ajusté à un pH moins acide les solutions effectuées avec de l'eau distillée dont le pH propre était de 5,8. Comme pour tous les essais précédents faits avec de l'eau distillée, nous avons choisi le pH 6,5 qui nous l'avons vu, ne varie pas au cours des essais, alors que dans ces solutions non tamponnées, une réaction voisine de la neutralité ou légèrement alcaline est modifiée par la présence des poissons. Les solutions ont été ajustées à ce pH par addition de quelques gouttes de soude normale par litre.

Nos résultats ont été groupés dans les tableaux XVI.

TABLEAU XVI

Action des sels de soduim, en solution dans l'eau distillée, des acides chlorhydrique, phénylpropionique, citrique et gluconique, sur Gasterosteus aculeatus.

Comme pour le XV, M représente la *molécule de base* (soit une demi molécule de sel pour le citrate utilisé qui est bibasique).

Température : 20°. pH : 6,5

Concentration moléculaire en base o/oo	Concentration des sels en gr. o/oo	Observations
	Chlorure de sodium	
M/545	0,106	Aucun trouble en 8 heures
M/272,5	0,212	id.
M/54,5	1,06	id.
	Phénylpropionate de sodium	
M/545	0,308	Aucun trouble en 8 heures
M/272,5	0,616	id.
M/136,25	1,232	1er symptôme d'intoxication au bout de 2 heures, 1 mort au bout de 5 heures. 4 intoxiqués, non morts au bout de 8 heures. remis dans l'eau pure : 1 survit.
M/109	1,54	1er symptôme au bout de 2 heures; 1 mort au bout de 5 heures ; 2 autres morts au bout de 7 heures ; 2 remis dans l'eau pure survivent.
	Citrate de sodium	
M/136,25	0,864	Aucun trouble en 8 heures
M/109	1,08	Aucun trouble en 3 heures ; 1er symptôme d'intoxication au bout de 4 heures ; tous les poissons sont morts entre 5 et 8 heures.
M/54,5	2,16	Aucun trouble en 2,5 h. — tous les poissons sont morts entre 3 h. et 5,5 h.
	Gluconate de sodium	
M/136,25	1,6	Aucun trouble en 8 heures.
M/109	2	id.
M/54,5	4	id.

En ce qui concerne le phénylpropionate de sodium, le caractère toxique de ce sel, aux concentrations étudiées, est suffisamment concluant pour que nous n'ayons pas jugé utile de poursuivre les essais à des concentrations supérieures.

Pour le phénylpropionate de sodium, les symptômes d'intoxication se manifestent tout d'abord par un léger engourdissement qui va en augmentant. L'animal ne fuit plus si on approche un agitateur, la respiration devient irrégulière. Peu avant la mort, l'animal devient agité et est secoué de mouvements convulsifs.

L'intoxication par le citrate présente les mêmes caractères que l'intoxication par le phénylpropionate, exception faite pour les mouvements convulsifs qui, dans ce cas, n'apparaissent pas.

Nous voyons ainsi que des concentrations de chlorhydrate et de gluconate de sodium qui s'étaient montrées parfaitement inoffensives dans l'eau de conduite à pH 7,8, le sont aussi dans l'eau distillée à pH 6,5. Par contre, des concentrations de phénylpropionate et de citrate de sodium non toxiques à pH 7,8 dans l'eau de conduite, provoquent à pH 6,5, dans l'eau distillée des troubles très nets chez les poissons. Ces troubles ne surviennent cependant qu'au bout de 2 heures ou 2 heures et demie, à des concentrations équivalentes à celles de phénylpropionate et de citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol qui provoqueront l'anesthésie en 8 minutes pour le phénylpropionate, et en 18 minutes pour le citrate.

2°) Action comparée du chlorhydrate du phénylpropionate, du citrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur les épinoches.

Pour déterminer les différences d'activité des divers sels de cette base nous avons, pour chaque essai, opéré comparativement avec le chlorhydrate. Connaissant la difficulté des dosages biologiques nous ne pouvons pas espérer obtenir toujours, pour le même sel, à des moments et avec des lots de poissons différents, des chiffres rigoureusement identiques.

En effet, en examinant les chiffres obtenus dans les différents essais, nous pouvons constater quelques variations dans les résultats obtenus pour le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. Alors que dans nos premiers essais de comparaison avec le phénylpropionate, les durées nécessaires pour obtenir la narcose sont respectivement de 6,2 ; 19,8 et 32,1 minutes aux concentrations moléculaires M/363, M/779 et M/1090, elles sont de 5,8 ; 17,8 et 26,2 minutes, aux mêmes concentrations, dans nos essais de comparaison avec le citrate. Nos essais ayant eu lieu à des périodes assez éloignées, nous pouvons peut-être attribuer ces différences à l'influence de la saison, et plus spécialement à l'influence du frai sur la résistance des poissons, comme PORTIER et GUEYLARD ont eu, eux aussi, l'occasion de le constater.

Les animaux ont été choisis dans le même lot et nous avons opéré avec des quantités de sels équivalentes en base, donc à des concentrations moléculaires identiques, à même température et à même pH.

Le chlorhydrate, le phénylpropionate et le citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol employés pour ces recherches sont les mêmes sels cristallisés que nous avons déjà utilisés dans nos précédents essais. Nous avons par contre préparé nous-mêmes les solutions de gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol à partir d'une solution à 87, 9 % d'acide gluconique : $CH_2OH — (CHOH)_4 — COOH$, (poids moléculaire 196), et de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol cristallisé. La solution d'acide gluconique avait été préparée pour nous par M. DELANGE au laboratoire de Laire. Un rapide calcul nous a permis d'établir les proportions de base et de solution acide nécessaires pour obtenir des solutions de gluconate, à des concentrations moléculaires correspondant (en base) à celles des solutions des autres sels de la même base.

Les conditions expérimentales sont toujours restées les mêmes, c'est-à-dire : accoutumance des animaux pendant 24 heures à 20° et maintien de cette température pendant

toute la durée des essais. Ces essais ont été effectués dans l'eau de conduite et dans l'eau distillée.

Eau de conduite. — Dans nos premiers essais effectués avec de l'eau de conduite nous avons, comme toujours, ajusté la réaction des solutions au pH 7,8. Pour le phénylpropionate, il a fallu au maximum IV gouttes par litre d'une solution de soude N 1 aux concentrations les plus fortes ; pour les solutions de citrate, le sel étant acide, il a fallu un maximum de L gouttes de soude N/1, et pour le gluconate, un maximum de V gouttes de soude N/1. Pour le chlorhydrate enfin, il n'a pas été nécessaire d'ajuster les solutions.

Dans les tableaux où nous avons groupé nos résultats, nous avons fait figurer les moyennes des durées nécessaires pour obtenir la narcose, d'une part avec le chlorhydrate, d'autre part avec les sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol et nous avons établi les rapports de ces temps de narcose en prenant pour unité les temps correspondant au chlorhydrate.

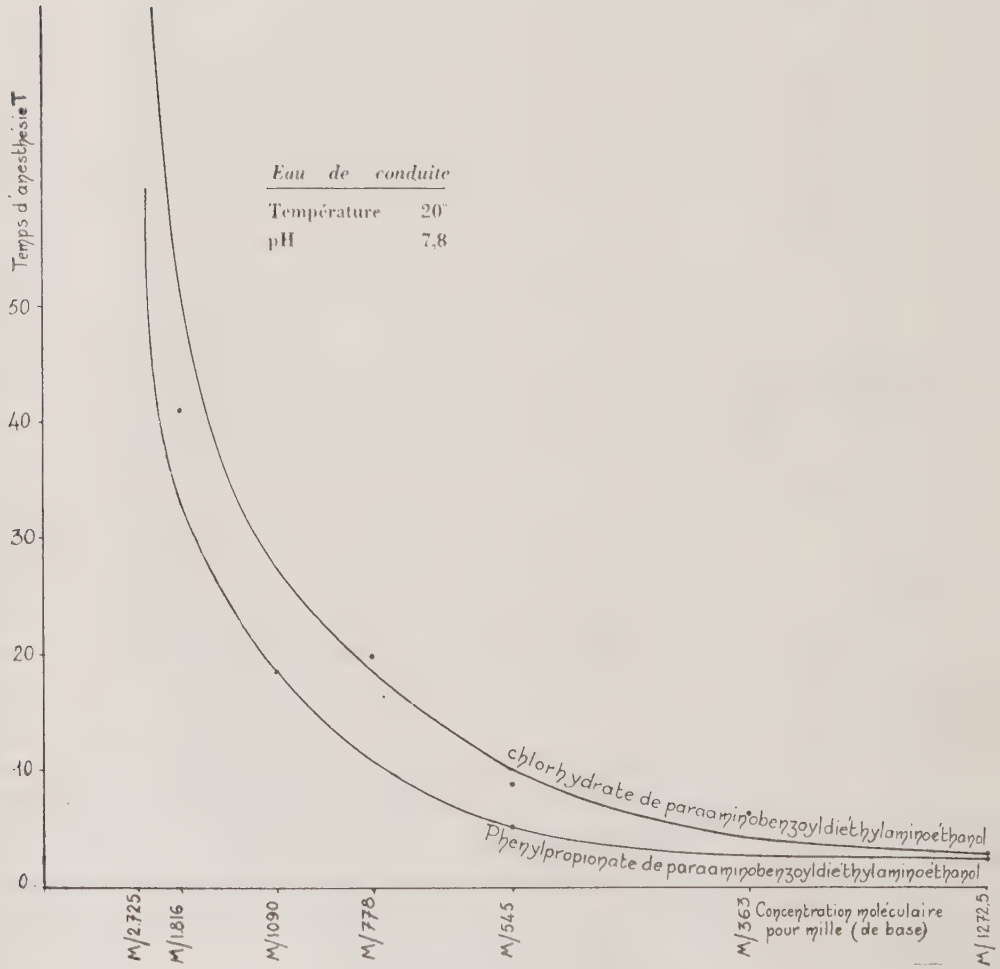
TABLEAU XVII

Action comparative du chlorhydrate et du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur les épinoches.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Concentrations : en poids de base ‰	molécul. en base	en gr. de sels pr mille Chlor.	Phénylpr	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes) Chlorhyd	Phényl.	Rapport des temps Phényl. / Chlorhyd
0,866 × 0,10	M/2725	0,10	0,1416	115,3	p. de 120	
× 0,15	M/1816	0,15	0,2124	41	32,1	0,78
× 0,25	M/1090	0,25	0,354	32,1	18,5	0,57
× 0,35	M/778	0,35	0,496	19,8	11,4	0,57
× 0,50	M/545	0,50	0,708	8,8	5,1	0,58
× 0,75	M/363	0,75		6,2		
× 1	M/272,5	1	1,416	2,9	2,5	0,86

Nous avons, comme dans tous nos précédents essais, traduit nos résultats par une courbe (concentrations moléculaires en abscisse, temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie en ordonnée). (courbes XI).



COURBES XI

Comparaison du chlorhydrate et du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Si nous considérons les valeurs du tableau et les courbes correspondantes, nous constatons que, pour des concentrations moléculaires équivalentes, les temps nécessaires pour obtenir la narcose avec le phénylpropionate sont plus courts qu'avec le chlorhydrate. Sauf dans la région assymptotique des courbes, où la mesure est évidemment moins précise, ce rapport semble constant.

Les mêmes essais repris avec le citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, comparativement avec le chlorhydrate nous ont donné les résultats que nous avons groupés dans le tableau suivant. Les chiffres ainsi obtenus ont permis de construire les courbes correspondantes. (courbes XII).

TABLEAU XVIII

Action comparative du chlorhydrate et du citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur les épinoches.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Concentration en poids de base °/oo	molécul. en base	en gram. de sels pour mille Chlor.	Citrate	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes). Ch orhyd	Citrate	Rap. des temps Citrate / Chlorhyd
0,866 × 0,10	M/2725	0,10	0,1251	pl. de 120	pl. de 120	
» 0,25	M/0901	0,25	0,313	26,2	35,7	1,36
» 0,35	M/778	0,35	0,4378	11,8	15,7	1,33
» 0,50	M/545	0,50	0,6255	8,0	11,6	1,45
» 0,75	M/363	0,75	0,9382	5,8	6,9	1,18
× 1	M/272,5	1	1,251	5	5,9	1,18

Les valeurs obtenues, et les courbes (courbes XII) qui les traduisent nous permettent de voir que, contrairement au phénylpropionate, les temps nécessaires pour obtenir la narcose sont plus longs avec le citrate qu'avec le chlorhydrate, pour des concentrations moléculaires équivalentes en base.

COURBES XII

Comparaison du chlorhydrate et du citrate de paraaminobenzoyl-diéthylaminoéthanol.

Nous avons enfin poursuivi cette étude comparative par l'essai du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Le tableau et les courbes qui suivent traduisent nos résultats (courbes XIII).

TABLEAU XIX

Action comparative du chlorhydrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur les épinoches.

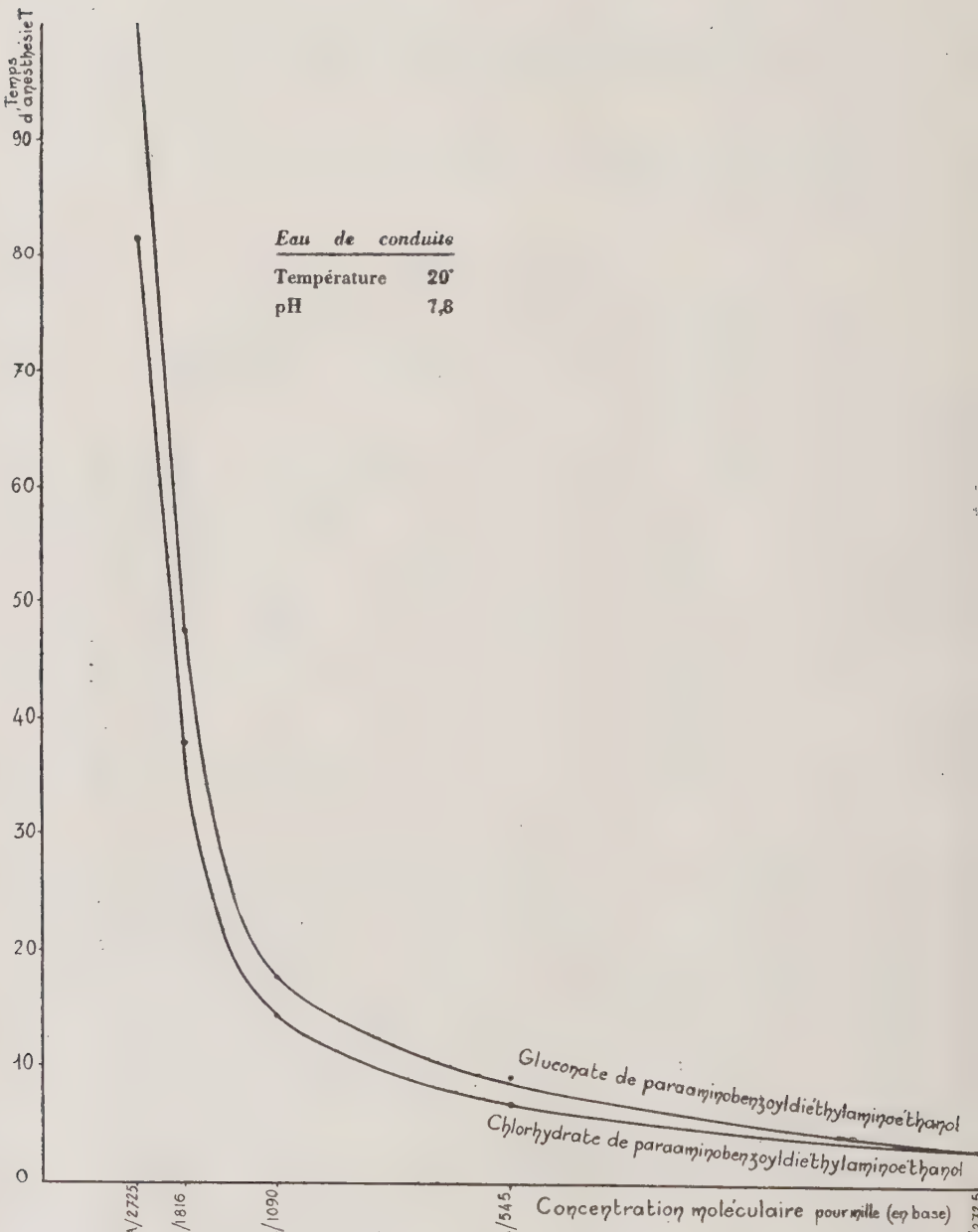
Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Concentration				Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)		Rapports des temps
en poids de base °/oo	molécul. en base	en grammes de sels pour mille		Chlorydr.	Glucon.	Glucon. / Chlorydr.
		Chlor.	Gluconat			
0,866 × 0,10	M/2725	0,10	0,158	81,5	102,8	1,26
× 0,15	M/1816	0,15	0,2377	38	47,8	1,25
× 0,25	M/1090	0,25	0,3962	14,3	17,8	1,24
× 0,50	M/545	0,50	0,7925	6,7	9	1,34
× 1	M/272,5	1	1,585	2,9	3	1,03

En considérant les valeurs des tableaux et les courbes correspondantes (courbes XIII), nous pouvons constater que les temps nécessaires pour obtenir la disparition du réflexe sont, à concentrations moléculaires équivalentes en base, toujours plus longs pour le gluconate que pour le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. Le rapport de ces temps est presque constant pour toutes les concentrations, sauf aux très fortes doses correspondant à la zone asymptotique des courbes.

Nous avons d'autre part établi les rapports inverses des précédents, en ce qui concerne le phénylpropionate, afin de pouvoir, comme pour les autres sels, exprimer numériquement la plus grande activité de ce sel par rapport au chlorhydrate.

Ces rapports sont représentés dans le tableau XX.



COURBES XIII

Comparaison du chlorhydrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

TABLEAU XX

Activités comparées du phénylpropionate et du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Concentration				Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)		Rapport d. temps Chlordr.
Molécul. en base	Poids de base pour °/₀₀	En grammes de sels pour mille				
		Chlor.	Phényl.	Chlorhy.	Phénylp.	Phénylpr
M/1816	0,866 × 0,15	0,15	0,2124	41	32,10	1,27
M/1090	0,866 × 0,25	0,25	0,354	32,1	18,5	1,73
M/779	0,866 × 0,35	0,35	0,496	19,8	11,4	1,73
M/545	0,866 × 0,50	0,50	0,708	8,8	5,1	1,72
M/272,5	0,866 × 1	1	1,1419	2,9	2,5	1,16

De l'examen de tous ces résultats, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1°) Les courbes correspondant aux différents sels ont toutes le même aspect général.

2°) Dans les conditions de nos essais, le phénylpropionate a un pouvoir anesthésique plus grand que le chlorhydrate, alors que, au contraire, le citrate et le gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol ont des activités moindres.

C'est ainsi que le phénylpropionate est 1,2 à 1,7 fois plus rapide dans son action que le chlorhydrate qui est lui-même 1,1 à 1,4 fois plus rapide que le citrate, et 1,03 à 1,3 fois plus actif que le gluconate.

Dans ces premiers essais qui ont eu pour but de mettre en évidence l'action du radical acide combiné à la base, nous avons employé l'eau potable dont la teneur en sels n'est pas négligeable, pour nos fortes dilutions. Il est possible que la présence de ces sels dans l'eau provoque des phénomènes de double décomposition avec nos sels d'alcaloïdes, phénomènes qui peuvent diminuer leurs différences d'activité.

Pour avoir des mesures plus exactes, il nous a paru indiqué de faire, en même temps que des essais dans l'eau potable, des essais dans l'eau distillée.

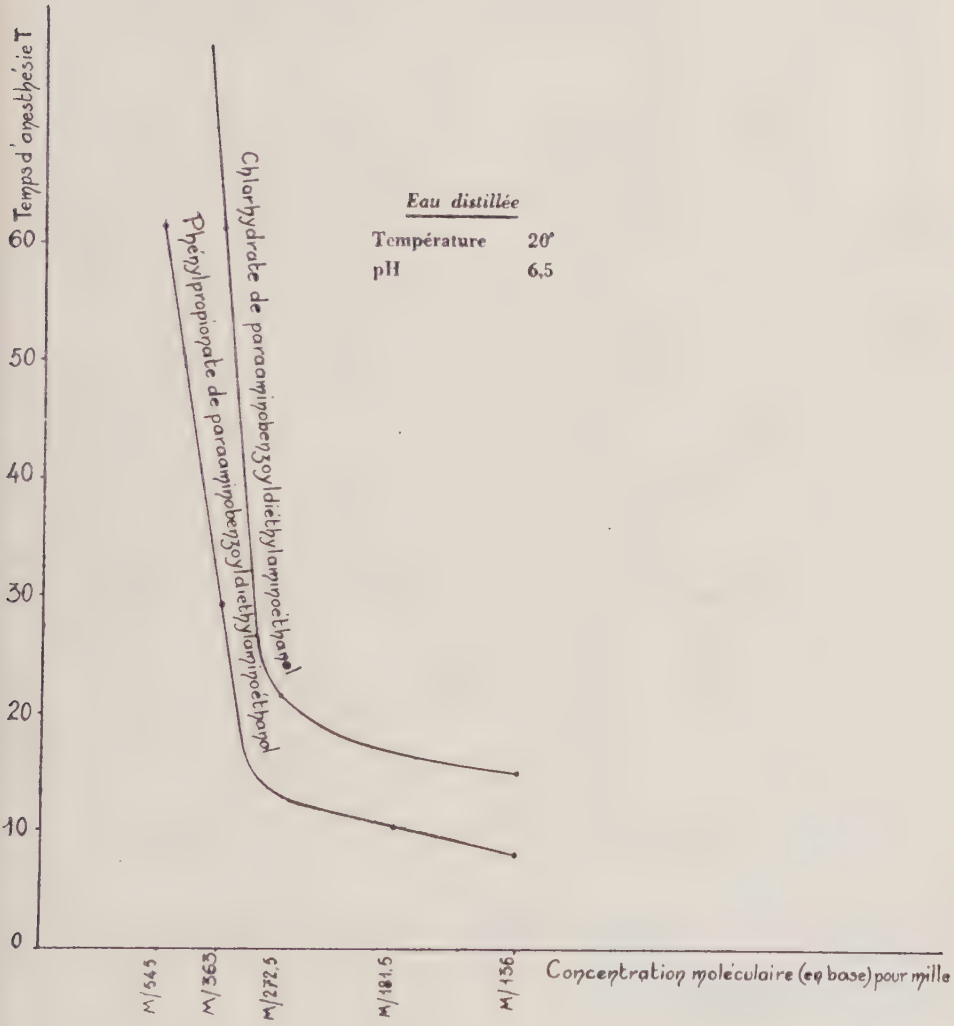
Eau distillée. — Ces essais ont été effectués dans les mêmes conditions expérimentales que les recherches dans l'eau potable. Les solutions ont été ajustées à pH 6,5. A ce pH pas trop acide, les durées nécessaires pour obtenir la narcose, aux concentrations envisagées, se trouvent dans les limites de sensibilité des mesures, et la présence des poissons ne modifie pas, comme nous l'avons vu, la réaction des solutions pendant la durée de l'immersion.

Pour le chlorhydrate, le phénylpropionate et le gluconate, il a fallu ajouter aux solutions I à IV gouttes de soude N/1 par litre, pour les amener au pH 6,5. Pour le citrate, XXX à LX gouttes de soude N/1 ont été nécessaires, ce qui s'explique facilement par le caractère acide du sel bibasique. Les autres conditions expérimentales, accoutumance et maintien de la température à 20° sont toujours identiques.

Nous avons, comme pour nos essais avec l'eau potable, groupé dans des tableaux les valeurs obtenues. Ces chiffres nous ont permis d'établir les rapports des temps nécessaires pour obtenir la narcose, pour les différents sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol et pour le chlorhydrate de la même base pris pour unité.

Le tableau XXI résume les résultats obtenus avec le chlorhydrate et le phénylpropionate.

Nous voyons que dans l'eau distillée, comme dans l'eau de conduite, le phénylpropionate agit plus rapidement que le chlorhydrate sur les poissons. L'examen des courbes correspondantes met également en évidence ces différences d'action. Les courbes obtenues pour les deux sels sont, en effet, nettement séparées, à toutes les concentrations envisagées. (courbe XIV).



COURBES XIV

Comparaison du chlorhydrate et du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

TABLEAU XXI

Activités comparées du chlorhydrate et du phénylpropionate de de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour Gasterosteus aculeatus.

Eau distillée. Température : 20°. pH : 6,5

Molécul. en base	Concentration en poids de base o/oo	Concentration en gram. de sels pour mille. Chlor.	Concentration en gram. de sels pour mille. Phényl	Temps nécessaires p. obtenir l'anesthésie (en min.) Chlorhy.	Temps nécessaires p. obtenir l'anesthésie (en min.) Phén.	Rapport des temps Phén./Chlor.	Rapport des temps Chl./Phén
M /545	0,866 × 0,50	0,50	0,708	pl. de 120	61,6		
M /363	0,866 × 0,75	0,75	1,062	61,50	29,2	0,47	2,10
M /272,5	0,866 × 1	1	1,416	21,5	12,4	0,57	1,73
M /181,5	0,866 × 1,5		2,124		10,1		
M /136	0,866 × 2	2	2,832	14,9	8	0,53	1,86

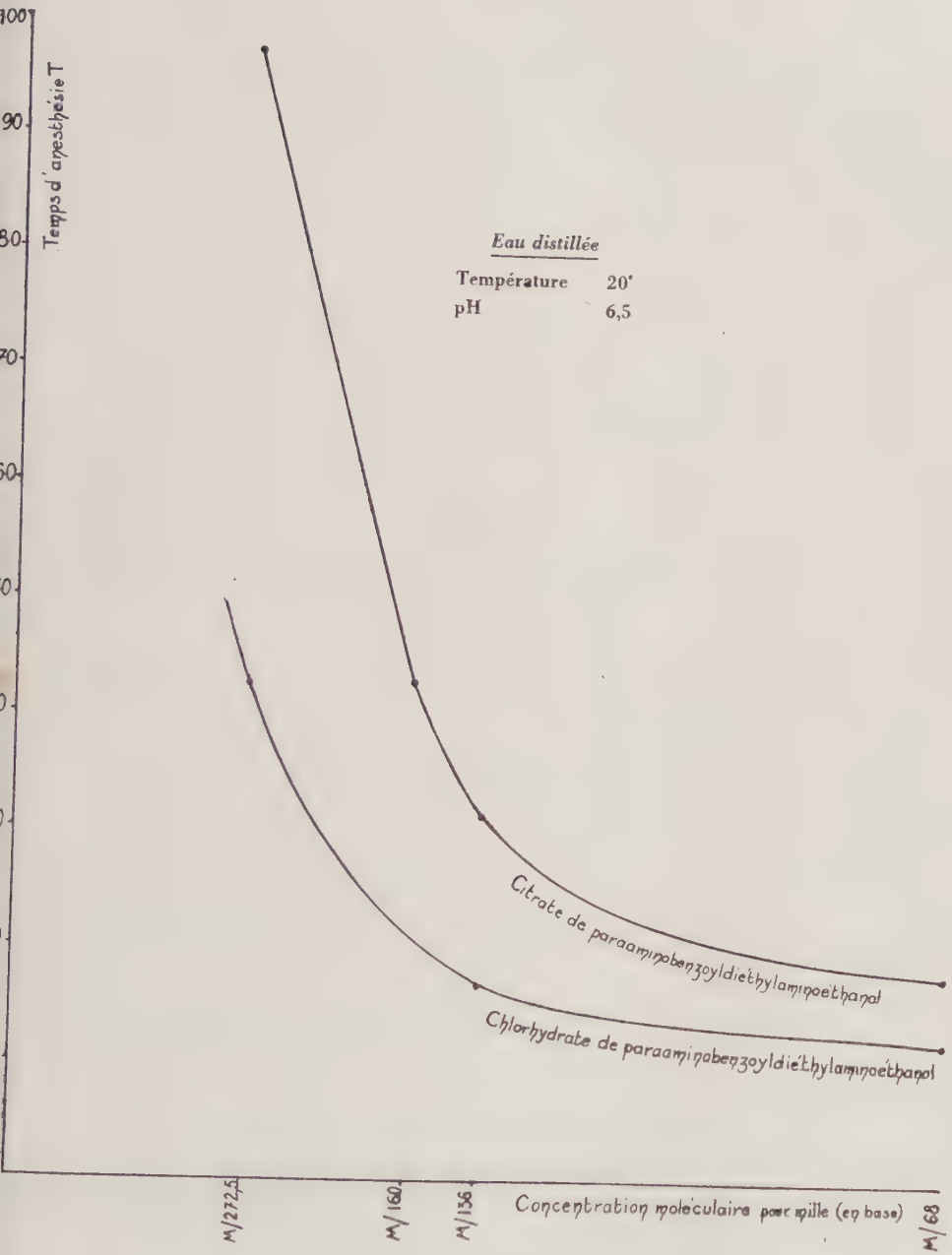
Les mêmes essais repris avec le citrate et le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, en solution dans l'eau distillée, à pH 6,5, nous ont permis de grouper dans le tableau suivant les valeurs trouvées, et de tracer les courbes « temps d'action-concentration ».

TABLEAU XXII

Activités comparées du chlorhydrate et du citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour Gasterosteus aculeatus.

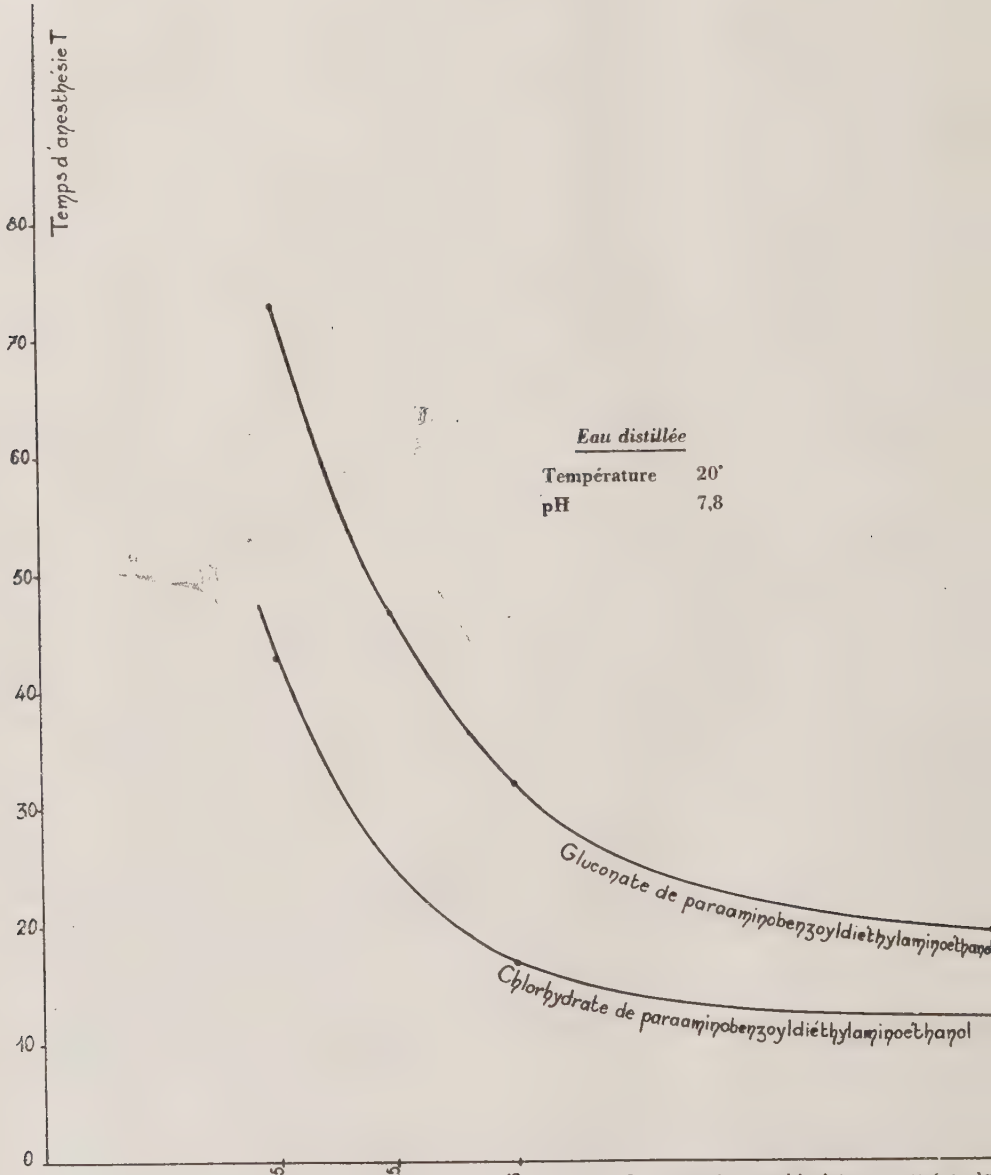
Eau distillée. Température : 20°. pH : 6,5

molécul. en base	Concentration en poids de base pour mille	Concentration en gram. de sels pour mille Chlor.	Concentration en gram. de sels pour mille Citra.	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes) Chlorhy.	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes) Citrate	Rapport d. temps : Citrate/Chlorhyd.
M /272,5	0,866 × 1	1	1,251	42,7	97	2,27
M /160	0,866 × 1,7		2,103		43,1	
M /136	0,866 × 2	2	2,502	16,8	31,4	1,86
M /68	0,866 × 4	4	5,004	12,1	17,9	1,47



COURBES XV

Comparaison du chlorhydrate et du citrate de paraaminobenzoyl-diéthylaminoéthanol.



COURBES XVI

Comparaison du chlorhydrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

L'examen de ces résultats et des courbes (courbes XV) nous montre que pour des concentrations moléculaires équivalentes en base, les temps d'anesthésie sont plus grands pour le citrate que pour le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. Ces différences apparaissent nettement sur les courbes qui restent séparées à toutes les concentrations.

Nos derniers essais comparatifs enfin, se rapportent au chlorhydrate et au gluconate de la même base. Opérant toujours dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons réuni nos résultats dans le tableau suivant et tracé les courbes « temps d'anesthésie-concentration ». (courbes XVI).

TABLEAU XXIII

Activités comparées du chlorhydrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour Gasterosteus aculeatus.

Eau distillée. Température : 20°. pH : 6,5

Concentration				Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)		Rapport d. temps Glucon. / Chlorh.
molécul. en base	en poids de base pour mille	en gram. de sels pour mille Chlor.	Glucon.	Chlorh.	Glucon.	
M/545	0,866 × 0,50	0,50	0,7925	pl. de 120	pl. de 120	
M/272,5	0,866 × 1	1	1,585	42,7	73,1	1,71
M/181,5	0,866 × 1,50		2,377		46,9	
M/136	0,866 × 2	2	3,17	16,8	32,3	1,91
M/68	0,866 × 4	4	6,34	12,1	19,1	1,57

Ici encore, le chlorhydrate est nettement plus actif que le gluconate. Nous voyons en effet que, si l'on prend pour unité les temps d'anesthésie du chlorhydrate, les temps pour le gluconate sont de 1,5 à 1,9 fois supérieurs.

Les essais effectués dans l'eau distillée donnent des résultats parallèles à ceux obtenus dans l'eau de conduite. Mais, les différences d'activité constatées entre les divers sels sont plus grandes dans l'eau distillée, de pH 6,5, que dans l'eau ordinaire de pH 7,8.

C'est ainsi que, selon les concentrations : le phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol est de 1,18 à 1,73 fois plus actif que le chlorhydrate dans l'eau de conduite et de 1,73 à 2,10 fois plus fort dans l'eau distillée.

Inversement, le citrate est de 1,18 à 1,44 fois moins actif que le chlorhydrate dans l'eau ordinaire et de 1,47 à 2,27 fois plus faible dans l'eau distillée.

Enfin, le gluconate est de 1,03 à 1,34 fois moins actif que la novocaïne officinale dans l'eau de conduite et de 1,57 à 1,91 fois moins fort dans l'eau distillée.

Des constatations analogues peuvent être faites en examinant les courbes « inverses » construites selon la technique de POWERS.

Les tableaux XXIV et XXV indiquent les réciproques de temps nécessaires à l'anesthésie, en fonction des concentrations, et sur les courbes qui leur correspondent, on voit nettement les différences d'activité des sels, différences plus accentuées pour les essais effectués en eau distillée. (courbes XVII, XVIII, XIX, XX et XXI).

Ces résultats concordent donc avec ceux obtenus par J. RÉGNIER, grâce à des techniques fort différentes ; ici encore, pour des concentrations moléculaires identiques en base, l'activité croit dans le sens : citrate-gluconate, chlorhydrate, phénylpropionate.

En résumé, les essais rapportés dans ce chapitre nous amènent aux conclusions suivantes :

1°) Les variations de température des solutions ont, sur l'activité du chlorhydrate, du phénylproprionate et du citrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol pour les épinoches, la même influence que sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne. Une élévation de température augmente en effet l'action anesthésique, une diminution est au contraire nettement défavorable.

2°) Comme pour le chlorhydrate de cocaïne, la concentration en ions H des solutions a une influence marquée sur

l'activité de la « novocaïne ». Les solutions sont d'autant plus actives que la concentration en ions H est moins forte.

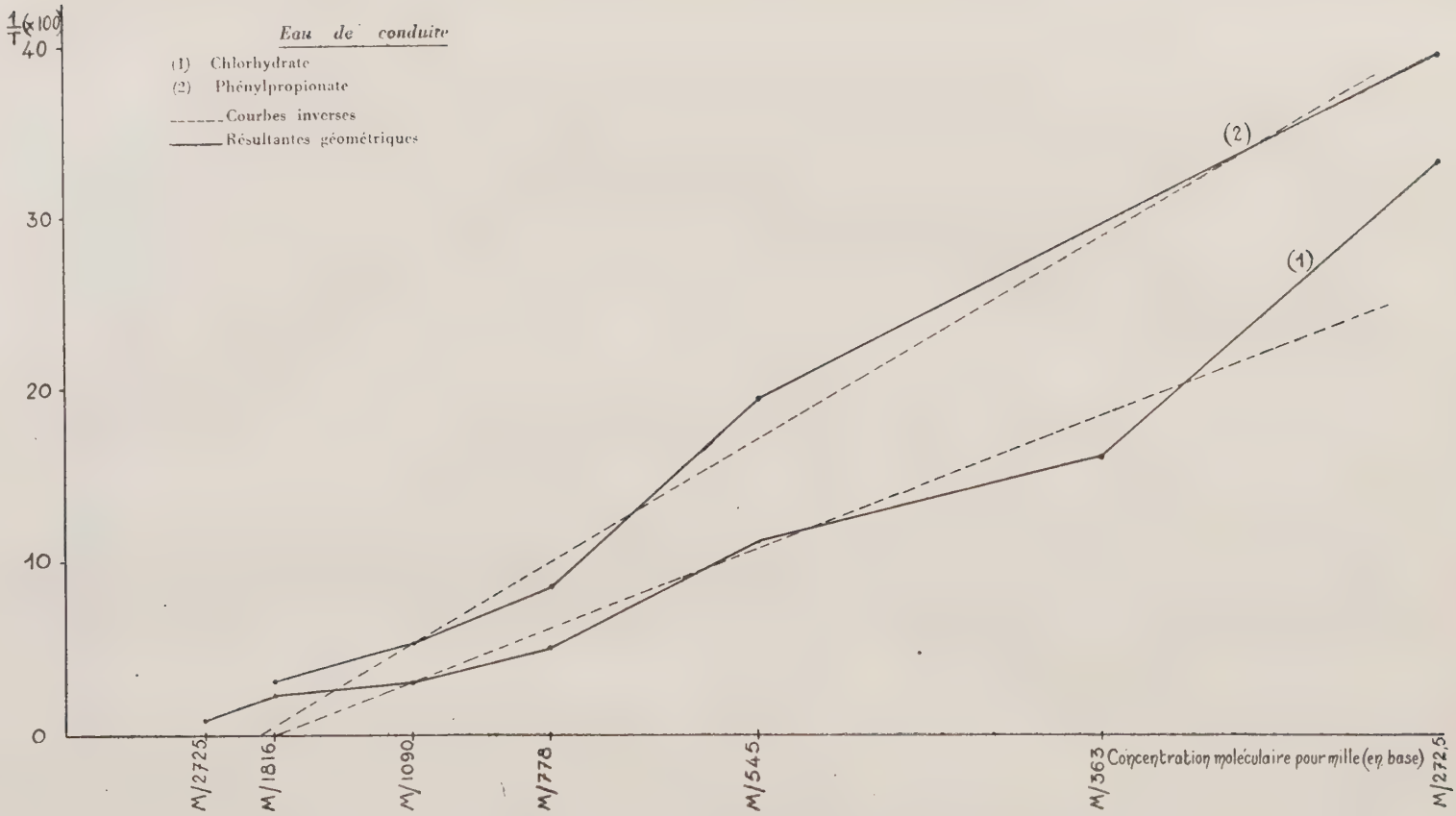
TABLEAU XXIV

Détermination des réciproques des temps nécessaires à l'anesthésie pour les sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, en solution dans l'eau de conduite.

Température : 20°. pH : 7,8

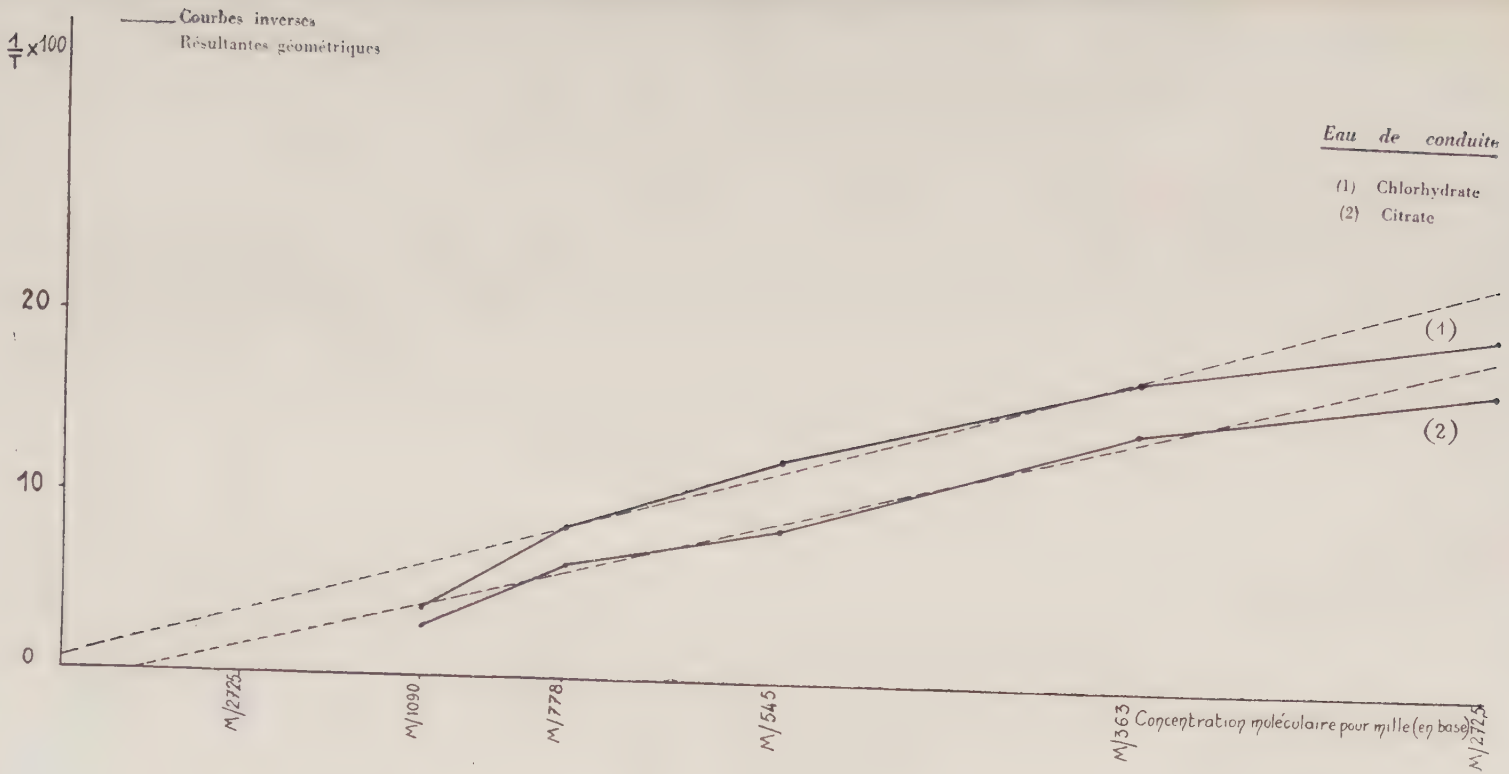
Concentration moléculaire en base	Base paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol					
	Chlorhydrate			*Phénylpropionate*		
	Concent. du sel en g. p. mille	T	1/T × 100	Concent. du sel en g. p. mille	T	1/T × 100
M/2725	0,10	115,3	0,8	0,1416	pl. de 120	
M/1816	0,15	41	2,4	0,2124	32,1	3,1
M/1090	0,25	32,1	3,1	0,354	18,5	5,4
M/778	0,35	19,8	5,0	0,496	11,4	8,7
M/545	0,50	8,8	11,3	0,708	5,1	19,6
M/363	0,75	6,2	16,1			
M/272,5	1	2,9	33,8	1,416	2,5	40
	Chlorhydrate			*Citrate*		
M/1090	0,25	26,2	3,8	0,313	35,7	2,8
M/ 778	0,35	11,8	8,4	0,4378	15,7	6,3
M/ 545	0,50	8,0	12,5	0,6255	11,6	8,6
M/ 363	0,75	5,8	17,2	0,9382	6,9	14,4
M/ 272,5	1	5	20	1,251	5,9	16,9
	Chlorhydrate			*Gluconate*		
M/2725	0,10	81,5	1,2	0,158	102,8	0,9
M/1816	0,15	38	2,6	0,2377	47,8	2,0
M/1090	0,25	14,3	6,9	0,3962	17,8	5,6
M/ 545	0,50	6,7	14,8	0,7925	9	11,1
M/ 272,5	1	2,9	34,4	1,585	3	33,3

3°) L'étude comparée des activités relatives du chlorhydrate de cocaïne et du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol nous a permis, dans des conditions expéri-



COURBES XVII

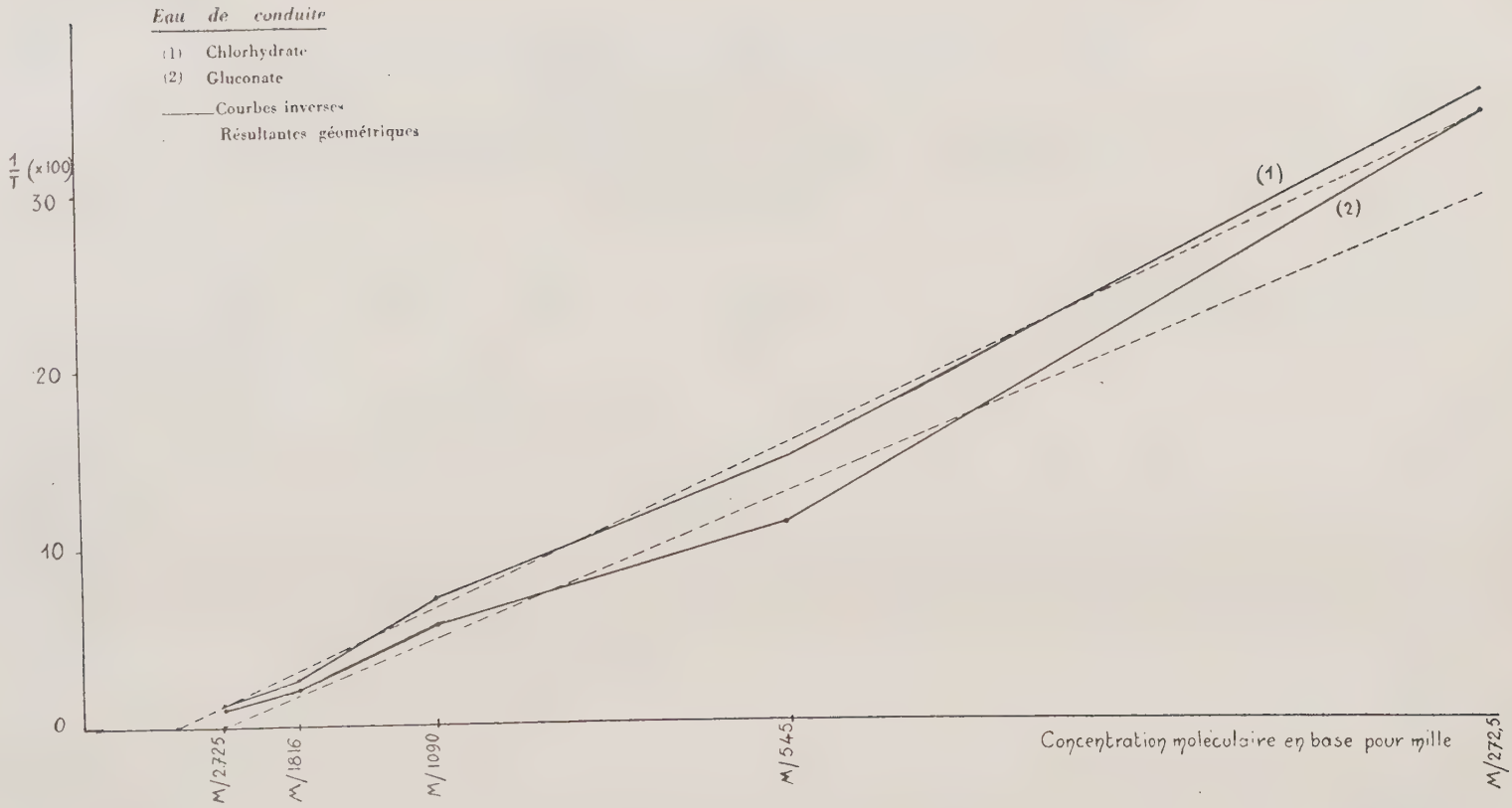
Comparaison du chlorhydrate et du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.



Courbes XVIII

Comparaison du chlorhydrate et du citrate de paraaminobenzoyl-diéthylaminoéthanol : *Eau de conduite.*

Courbes inverses des courbes XII :
« Concentration moléculaire-réciproque des temps d'anesthésie (× 100) ».



COURBES XIX

Comparaison du chlorhydrate et du gluconate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol. *Eau de conduite :*

Courbes inverses des courbes XIII :
« Concentration moléculaire-réciproque des temps d'anesthésie (× 100) ».

mentales précises, d'établir un rapport entre ces activités : pour des concentrations moléculaires équivalentes comprises dans une zone qui permet des mesures sensibles, et que nous avons précisée, le chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol est environ neuf à treize fois moins actif que le chlorhydrate de cocaïne pour les épinoches.

TABLEAU XXV

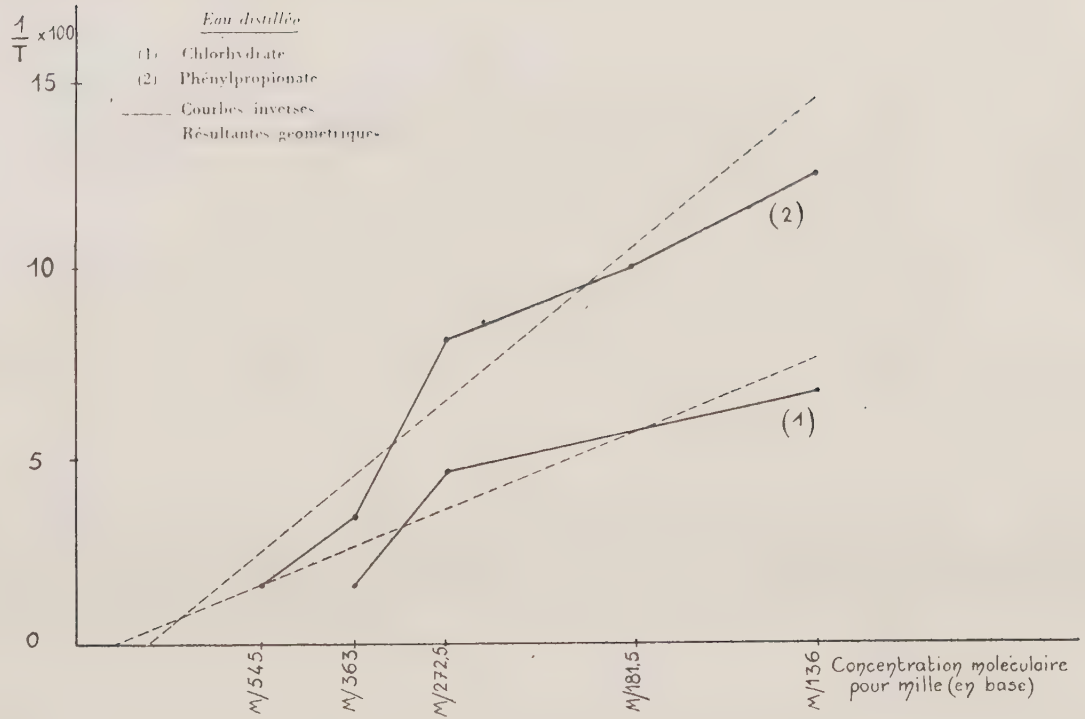
Détermination des réciproques des temps nécessaires à l'anesthésie pour les sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, en solution dans l'eau distillée.

Température : 20°. pH : 6,5

Concentration moléculaire en base	Base paraaminobenzoyldiethylaminoethanol					
	Chlorydrate			*Phénylpropionate*		
	Concent du sel en g. pr mil.	T	1/T × 100	Concent. du sel en g. pr mil.	T	1T × 100
M/545	0,50			0,708	61,6	1,6
M/363	0,75	61,5	1,6	1,062	29,2	3,4
M/272,5	1	21,5	4,6	1,416	12,4	8,0
M/181,5	1,50			2,124	10,1	9,9
M/136	2	14,9	6,7	2,832	8	12,5

	Chlorhydrate			*Citrate*			*Gluconate*		
	Conc. du sel eng. ‰	T	1/T × 100	Conc. du sel en g. ‰	T	1/T × 100	Conc. du sel en g ‰	T	1/T × 100
M/272,5	1	42,7	2,3	1,251	97	1,0	1,585	73,1	1,3
M/181,5	1,5						2,377	46,9	2,1
M/136	2	16,8	5,9	2,502	31,4	3,1	3,17	32,3	3,0
M/68	4	12.1	8,2	5,004	17,9	5,5	6,34	19,1	5,2

La comparaison est facilitée en utilisant les « courbes inverses » préconisées par Ed. B. Powers. En examinant les courbes que nous avons ainsi obtenues et leur résul-

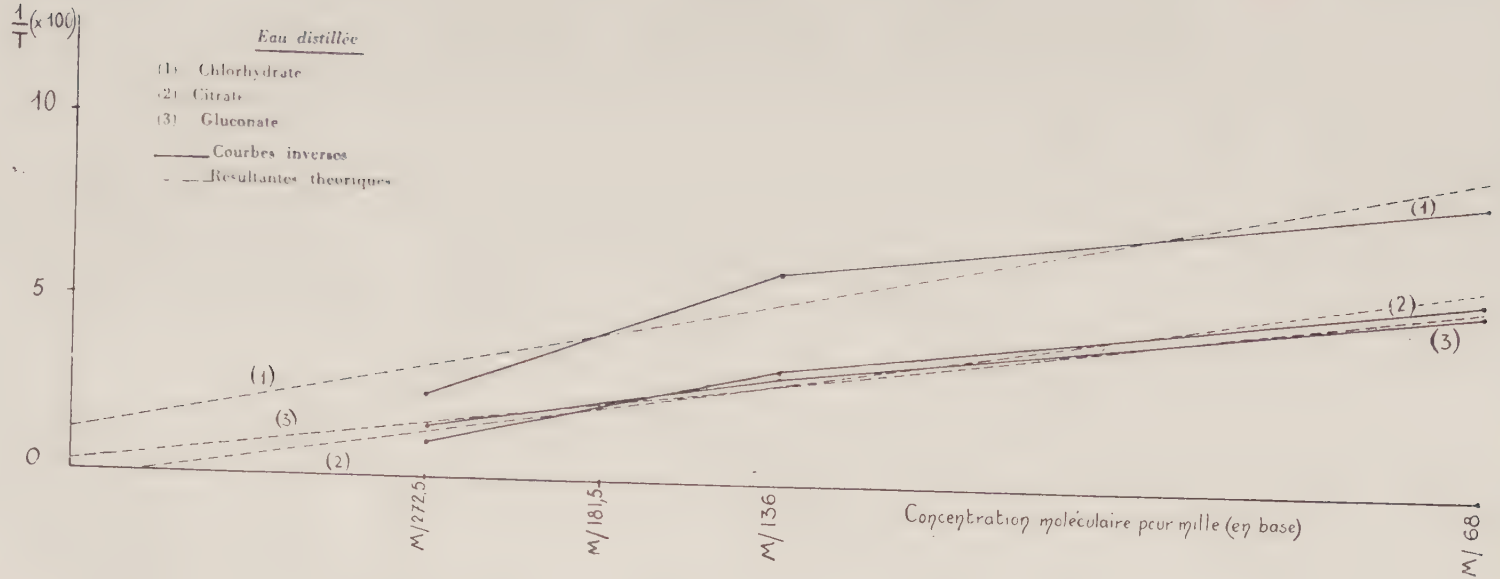


COURBES XX

Comparaison du chlorhydrate et du phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Courbes inverses des courbes XI :

« Concentration moléculaire-réciproque des temps d'anesthésie (× 100) ».



COURBES XXI

Comparaison du chlorhydrate, du citrate et du gluconate de para-aminobenzoyldiéthylaminoéthanol.

Courbes inverses des courbes XV et XVI :
« Concentration moléculaire-réciproque des temps d'anesthésie (× 100) ».

tante géométrique nous voyons en effet que le tracé correspondant au chlorhydrate de cocaïne présente une pente nettement plus accusée que celui de la « novocaïne », ce qui correspond à une plus grande activité.

4°) Les essais poursuivis avec les différents sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, effectués dans le but de déterminer l'influence de l'acide salifiant la base sur le pouvoir anesthésique, nous ont permis de mettre en évidence les différences d'activité de ces sels. Dans les conditions de nos essais, à quantités de base égales, nous avons pu, à pH 7,8 dans l'eau potable, et à pH 6,5 dans l'eau distillée, constater que les sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol peuvent être classés par ordre d'activité croissante de la manière suivante : citrate-gluconate, chlorhydrate, phénylpropionate.

Comme pour l'étude comparative du chlorhydrate de cocaïne et du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, l'examen des « courbes inverses » obtenues par la technique de Ed. B. Powers facilite la lecture des résultats qui sont de cette façon clairement mis en évidence.

Les résultats ainsi trouvés concordent avec ceux déjà obtenus par J. Régnier et ses collaborateurs grâce à des techniques différentes (cornée de lapin, cellules du mycelium d'*Ascoïdea rubescens*, cellules des feuilles d'*Elodea canadensis*).

5°) Les expériences effectuées dans le but de rechercher si les acides salifiant la base anesthésique sont pourvus d'une toxicité propre nous ont amenés aux constatations suivantes : les sels de sodium des acides chlorhydrique, phénylpropionique, citrique et gluconique sont, en solution dans l'eau potable à pH 7,8, et dans l'eau distillée à pH 6,5, dénués de toute toxicité pour les épinoches, à des concentrations moléculaires équivalentes en base aux concentra-

tions correspondantes des sels anesthésiques qui provoquent la narcose dans les limites que nous nous sommes fixées. Le phénylpropionate et le citrate de sodium présentent cependant, en solution dans l'eau distillée, une certaine toxicité pour les poissons, mais celle-ci n'intervient qu'au bout d'un temps beaucoup plus long que celui qui est utilisé dans nos essais.

CHAPITRE IV

ACTION DE DIVERS ANESTHESIQUES LOCAUX SUR LES POISSONS

MODE D'ACTION : ANESTHESIE OU TOXICITÉ

Il nous a paru intéressant d'étendre nos recherches à un certain nombre de succédanés synthétiques de la cocaïne utilisés couramment dans la pratique clinique : delcaïne, stovaïne, butelline, tutocaïne, pantocaïne et percaïne.

Rappelons rapidement les principales propriétés et applications de ces anesthésiques :

La *delcaïne*, C17 H21 N O4, ClH, est le chlorhydrate de pseudococaïne droite. (P.M. 339,8). On l'utilise en général pour les mêmes usages et aux mêmes doses que la cocaïne gauche officinale : en solutions de 1 à 5 pour cent, en instillations et badigeonnages, pour insensibilisation du larynx, des muqueuses nasales et des voies génito-urinaires ; en solution à 0,015 pour cent en rachianesthésie, et en solution à 1 pour cent pour l'anesthésie locale chirurgicale.

Le produit que nous avons utilisé provenait de la maison Roques.

La *tutocaïne*, C14, H22 N2 O2, ClH, ou chlorhydrate de paraaminobenzoyl 1 diméthylamino 2 méthyl 3 butanol, (P.M. 286,5), est utilisée pour l'anesthésie locale, en solutions à 0,5 et 1 pour cent. Nous avons, pour nos essais, employé un produit de la maison Bayer qui nous a procuré aussi la pantocaïne.

La *butelline*, C18 H30 N2 O2, SO4H2 est le sulfate de para-amino-benzoyl-dibutyl-amino-propanol. (P. M. 404). Nous avons utilisé un produit fourni par les usines Spécia. Ce sel anesthésique est en général utilisé en solutions à 0,05, 0,10 et 0,20 pour cent, en injections intrarachidiennes, en solutions à 0,5 et 1 pour cent en stomatologie, et à 5 et 10 pour cent en application directe, en oto-rhino-laryngologie.

La *stovaïne*, C14 H21 N O2 ClH, est le chlorhydrate de benzoyl-diéthyl-amino-diméthyl-carbinol. (P. M. 271,6). Elle est employée en anesthésie locale en laryngologie à la concentration de 1/10, elle est aussi utilisée en injections hypodermiques à la concentration de 0,75 et 1 pour cent, et en injections intrarachidiennes à la concentration de 10 pour cent dans de l'eau salée physiologique, dont on emploie 0,5 cm³. Le sel que nous avons employé nous a été fourni par la maison Spécia.

La *pantocaïne*, C15 H24 N2 O2, ClH est le chlorhydrate de para-butyl-amino-benzoyl-diméthyl-amino-éthanol. (P. M. 306,6). On l'emploie, comme la novocaïne, à des concentrations de 1 pour mille pour infiltrations, de 0,5 pour cent pour l'anesthésie lombaire, et de 1 et 2 pour cent pour l'anesthésie superficielle.

La *percaïne*, C2O H29 N3 O2 ClH, ou chlorhydrate de α butyl-oxy-diéthyl-amino-éthylidènecinchonin ylamide (P. M. 379,5) est utilisée pour l'anesthésie par infiltration à des concentrations de 0,5 et 2 pour mille. On l'emploie également en solution à 1 pour mille, pour anesthésie régionale, en solution dans l'eau salée physiologique.

Nous avons, pour nos essais, utilisé la percaïne Ciba.

La *novocaïne*, enfin, qui nous l'avons vu est le chlorhydrate de para-amino-benzoyl-diéthyl-amino-éthanol, est utilisée en injections hypodermiques et tissulaires à des concentrations variant de 0,50 à 2 pour cent. On l'emploie aussi, en solution à 5 pour cent (2 à 3 cm³) en injections intrarachidiennes.

Comme dans nos précédents essais, nous avons utilisé la « Scurocaïne » fournie par les Usines du Rhône.

1) ESSAIS COMPARATIFS DE L'ACTIVITÉ DE DIVERS SUCCÉDANÉS DE LA COCAINE.

Ces essais ont été effectués dans les conditions expérimentales précédemment décrites. Les solutions, dans l'eau de conduite à pH 7,8, ont été réglées à ce même pH par addition de soude N 1. Les quantités de soude à ajouter varient selon les sels et selon les concentrations. A la concentration de 0 g. 50 pour mille, il faut en effet XXIII gouttes par litre de soude N 1 pour ajuster le pH de la solution de delcaïne, XIX gouttes pour celle de stovaïne, XV pour celle de tutocaïne, X pour celles de cocaïne et de pantocaïne, VII pour celle de novocaïne et IV pour celle de butelline.

A la concentration de 0 g. 25 pour mille, le nombre de gouttes de soude N 1 nécessaire est X pour la delcaïne, VII pour la stovaïne, V pour la tutocaïne, le chlorhydrate de cocaïne et la pantocaïne, IV pour la novocaïne et II pour la butelline.

A la concentration de 0 g. 10 pour mille, le nombre de gouttes devient VI pour la delcaïne, IV pour la stovaïne, III pour la tutocaïne, le chlorhydrate de cocaïne et la pantocaïne, I pour la novocaïne et la butelline, et à la concentration de 0 g. 05 pour mille, on doit employer IV gouttes pour la delcaïne, III pour le chlorhydrate de cocaïne et la tutocaïne, I pour la stovaïne, la butelline et la pantocaïne, alors qu'il n'est pas nécessaire d'ajuster les solutions de novocaïne.

A la concentration de 0 g. 025 pour mille et aux concentrations inférieures, on ajoute I ou II gouttes seulement de soude N 1, sauf pour les solutions de novocaïne dont le pH reste constant.

Dans le cas des solutions de percaïne, il est impossible d'ajuster les solutions au pH 7,8, dans les mêmes conditions que les autres sels anesthésiques. Dans l'eau de conduite, à pH 7,8, la percaïne aux doses de 0 g. 05 à 1 gr. pour mille, précipite en un louche blanc plus ou moins dense selon la concentration.

Attribuant cette précipitation au déplacement de la base anesthésique, en milieu relativement alcalin, nous avons cherché à déterminer le pH limite assurant la stabilité du sel en solution.

A de l'eau de conduite préalablement ajustée à des pH plus acides, entre pH 6,5 et pH 7,6, par addition d'une solution d'acide chlorhydrique N/1, on a ajouté de la percaïne, aux doses de 0 g. 05 à 1 g. pour mille. La première solution parfaitement limpide au moment de la préparation et le demeurant pendant plusieurs jours d'observation est celle effectuée avec l'eau de conduite ajustée au pH 6,9. Avec l'eau à pH 7,0, en effet, on observe la précipitation signalée pour les pH plus alcalins. Il apparaît nécessaire d'effectuer les solutions avec de l'eau dont le pH est au maximum 6,9. Dans une telle eau, la dissolution de percaïne à la concentration de 0 gr. 05 à 1 g. pour mille abaisse la concentrations en ions H, et la solution a finalement un pH 6,5, pH qui représente donc le pH limite utilisable pour la percaïne.

Nous avons en outre voulu nous assurer que seule l'alcalinité est responsable de la précipitation de la percaïne, que cette précipitation n'est pas imputable aux sels dissous dans l'eau de conduite, et qu'il n'y a pas d'inconvénient à utiliser l'eau ordinaire plutôt que l'eau distillée.

La dissolution dans de l'eau distillée de pH 6,0 de 1 g. pour mille de percaïne abaisse le pH de la solution à 5,8. A une telle solution nous avons ajouté goutte à goutte une solution de soude N/1, jusqu'à l'apparition d'un faible louche, qui a lieu lorsque la concentration en ions H a atteint le pH 6,7. Ces résultats nous conduisent à admettre que la précipitation est due à l'alcalinité, et qu'il est préférable, pour nos essais, d'utiliser l'eau de conduite, les raisons de ce choix restant les mêmes que celles que nous avons précisées en établissant notre technique.

Dans la pratique, nous avons utilisé de l'eau de conduite préalablement ajustée au pH 6,9 ; la dissolution de la percaïne à toutes les concentrations considérées abaissant

le pH à la valeur 6,5, et nous avons, pour toutes les concentrations, opéré comparativement avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne, dans l'eau de conduite, à ce même pH 6,5. Comme pour la percaïne, les solutions ont été effectuées dans de l'eau de conduite réglée à pH 6,9, et il a fallu pour ajuster au pH 6,5 ajouter XL gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique N 1 par litre à la concentration de 1 g. pour mille de chlorhydrate de cocaïne, XXX gouttes pour les concentrations de 0 g. 50 et 0 g. 25 pour mille, XV gouttes pour la concentration de 0 gr. 10 pour mille et VII gouttes pour la concentration de 0 g. 05 pour mille.

Nous avons donc été obligés d'effectuer séparément nos essais comparatifs de l'action de la percaïne et de la cocaïne et de reporter les résultats relatifs à ces essais dans un paragraphe ultérieur.

a) Actions comparées du chlorhydrate de cocaïne, de la delcaïne, de la stovaïne, de la butelline, de la tutocaïne et de la pantocaïne sur les épinoches.

Nous avons appliqué la technique décrite dans nos précédentes expériences : pour chaque essai, dix poissons ont été prélevés dans l'aquarium et accoutumés pendant vingt-quatre heures à la température de 20°, température des essais.

Il est en outre important d'insister sur le fait que la résistance des poissons pouvant, comme nous l'avons déjà signalé, varier légèrement sous l'influence de différents facteurs tels que saison, frai, provenance, etc..., tous les essais ont été effectués simultanément pour tous les sels anesthésiques, à chaque concentration. Particulièrement en ce qui concerne les fortes concentrations provoquant la narcose en des temps inférieurs à 1 minute, les poissons ont été placés un à un dans les solutions de chaque anesthésique, ceux-ci étant étudiés dans la même journée. Les solutions ont été en outre préparées avec la même eau et les essais effectués avec des animaux provenant d'un même lot.

Nous avons réuni dans un premier tableau les moyennes des durées nécessaires pour obtenir l'action narcotique en fonction des concentrations pour les différents anesthésiques, en solution dans l'eau de conduite à pH 7,8.

TABLEAU XXVI

Action comparée de divers anesthésiques locaux sur Gasterosteus aculeatus.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie en m.						
Conc en gr. p. mille	Pant.	Stov.	Delc.	Chl. de cocaïne	Butel.	Tut.	Novoc
0,50	0,2	0,5	0,6	0,7	1,3	4,7	5,3
0,25	0,3		1,3	1,5	3,3	10,1	17,9
0,10	0,4	1,6	1,5	4,5	4,2	28,2	pl. de 120
0,05	0,7	4,5	6,3	14	8,1	64,2	
0,025	1,2	10,5	12,5	64	20,4	pl. de 120	
0,02		15,3					
0,01	2,2	57,8	42,1	pl.de 120	67,7		
0,005	5,3						
0,0045	16,8						
0,004	20,1						
0,003	24,9						
0,0025	25,8						
0,001	pl. de 120						

Pour nous tenir parfaitement dans le cadre de la technique que nous avons précisée, nous avons fait figurer sur le tableau, seulement pour mémoire, les chiffres correspondants à des temps de narcose inférieurs à 0,5 minutes et n'avons pas tenu compte de ces résultats pour établir nos courbes comparatives, la mesure de ces temps très courts n'étant pas suffisamment précise, comme nous l'avons déjà signalé.

Dans le but d'établir une échelle des activités comparées de ces divers anesthésiques, nous avons cherché à construire les courbes « temps d'action-concentrations ».

Un premier essai, en utilisant les concentrations équimoléculaires, ne nous a pas donné satisfaction. Il est bien entendu très facile de traduire pour chaque sel les concentrations pondérales en concentrations moléculaires (1), mais les courbes obtenues (courbes XXII) en portant en abscisse les concentrations et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'état narcotique ne sont pas suffisamment distinctes les unes des autres. Seules, la novocaïne, la tutocaïne et la pantocaïne présentent des propriétés anesthésiques nettement différentes de celles des autres composés. Les autres tracés se superposent aux fortes et aux faibles concentrations, c'est-à-dire dans les régions asymptotiques, et ne se différencient pas d'une manière régulière dans la portion sensible des courbes.

Au contraire, en utilisant simplement les poids d'anesthésiques en solution, tels qu'ils sont donnés par le tableau XXVI et tels qu'ils sont d'ailleurs formulés en médecine pratique, on obtient des tracés mieux séparés les uns des autres (courbes XXIII) qui nous permettent de formuler les conclusions suivantes :

1°) A la plus forte concentration utilisée, 0 g. 50 pour mille, les substances s'ordonnent de la manière suivante, de la plus active à la moins active :

pantocaïne, stovaïne-delcaïne, chlorhydrate de cocaïne-butelline, tutocaïne-novocaïne, ces deux derniers produits étant nettement moins actifs que tous les autres.

2°) A la concentration moyenne de 0 g. 10 pour mille, les anesthésiques essayés se classent par

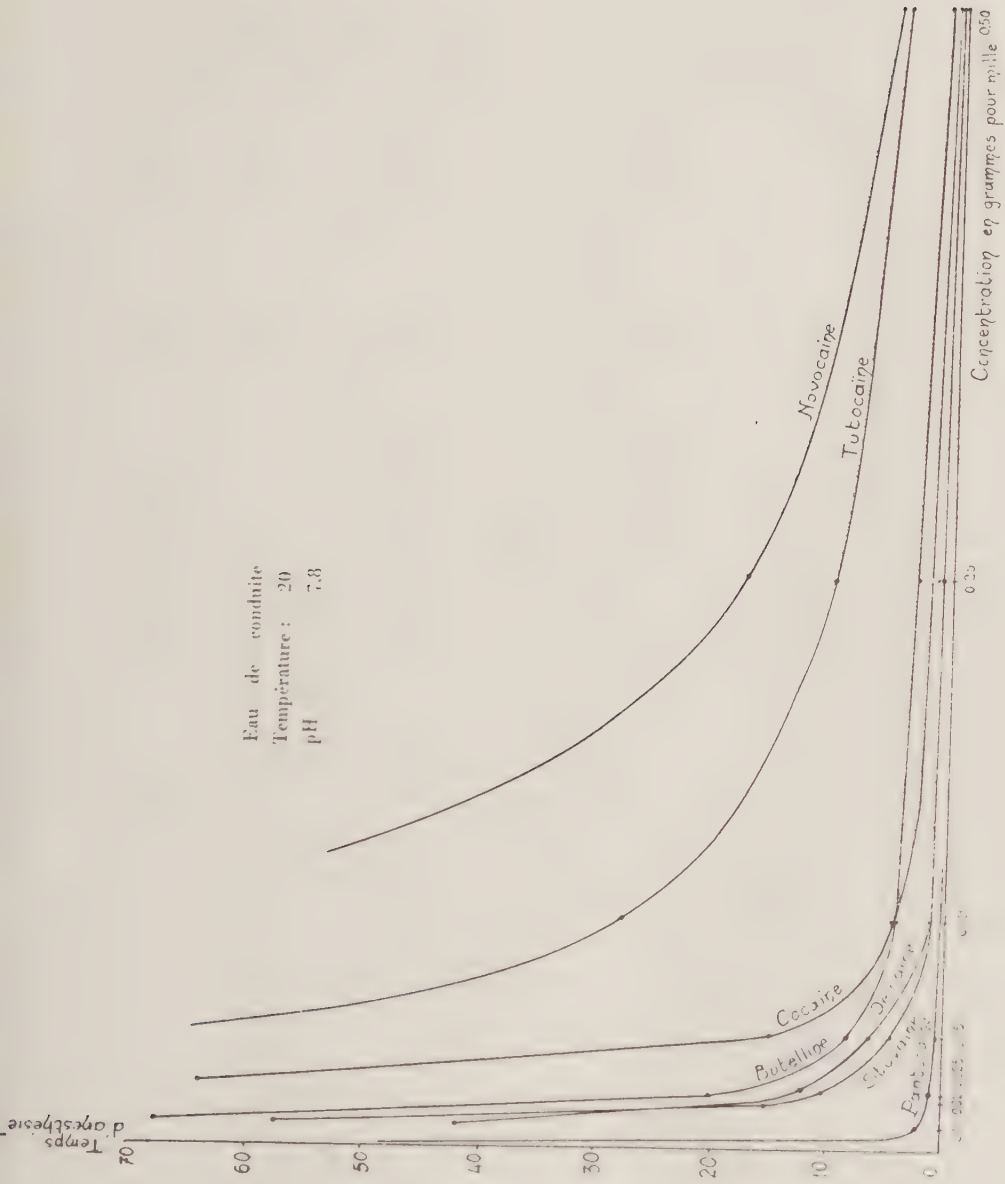
---

(1) Rappelons à titre d'exemple les chiffres suivants :

Une solution de pantocaïne à 0 gr. 50 °/₀₀		correspond à	une solution	M/613.
«	chl. cocaïne	«	«	M/678.
«	delcaïne	«	«	M/678.
«	stovaïne	«	«	M/543.
«	tutocaïne	«	«	M/573.
«	butelline	«	«	M/808.
«	novocaïne	«	«	M/545.
«	percaïne	«	«	M/758.

Courbes XXII

Comparaison de l'action de divers anesthésiques locaux.
« Temps d'action-concentration moléculaire ».



COURBES XXIII

Comparaison de divers anesthésiques locaux sur Gasterosteus **aculeatus** : « Temps d'action-concentration (en grammes pour mille) ».

ordre d'activité décroissante, de la façon suivante :

pantocaïne, delcaïne-stovaïne ; butelline-chlorhydrate de cocaïne ; tutocaïne ; novocaïne ; ces deux dernières se montrant toujours très nettement inférieures aux autres.

3°) Certains tracés peuvent s'entrecroiser : le chlorhydrate de cocaïne est plus actif que la butelline aux fortes concentrations, mais il agit moins rapidement quand la dilution augmente.

4°) La pantocaïne agit encore sur les épinoches, à des dilutions considérables : 0 g. 0025 pour mille, alors que le chlorhydrate de cocaïne n'a pratiquement plus d'action à partir de 0 g. 01 pour mille.

Si, comme nous l'avons fait précédemment, nous construisons les courbes « inverses », et leur résultante géométrique, nous sommes conduits à des remarques analogues concernant l'activité relative de ces divers anesthésiques. Ces courbes (courbes XXIV) ont été construites en utilisant les chiffres du tableau XXVII qui donne, en fonction des concentrations l'inverse des temps nécessaires pour obtenir la narcose.

TABLEAU XXVII

Détermination des réciproques des temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie : $1/T \times 100$.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Conc. en gr. pour mille	Chlor. de Cocaïne		Novocaïne		Stovaïne		Delcaïne	
	T	100/T	T	100/T	T	100/T	T	100/T
0,0025								
0,003								
0,004								
0,0045								
0,005								
0,01					57,8	1,7	42,1	2,3
0,025	64	1,5			10,5	9,5	12,6	7,9
0,05	14,5	7,1			4,5	22,2	6,3	15,8
0,10	4,5	22,2			1,6	62,5	1,5	66,6
0,25	1,5	66,6	17,9	5,5			1,3	76,9
0,50	0,7	142,8	5,3	18,8	0,5	200	0,6	166,6

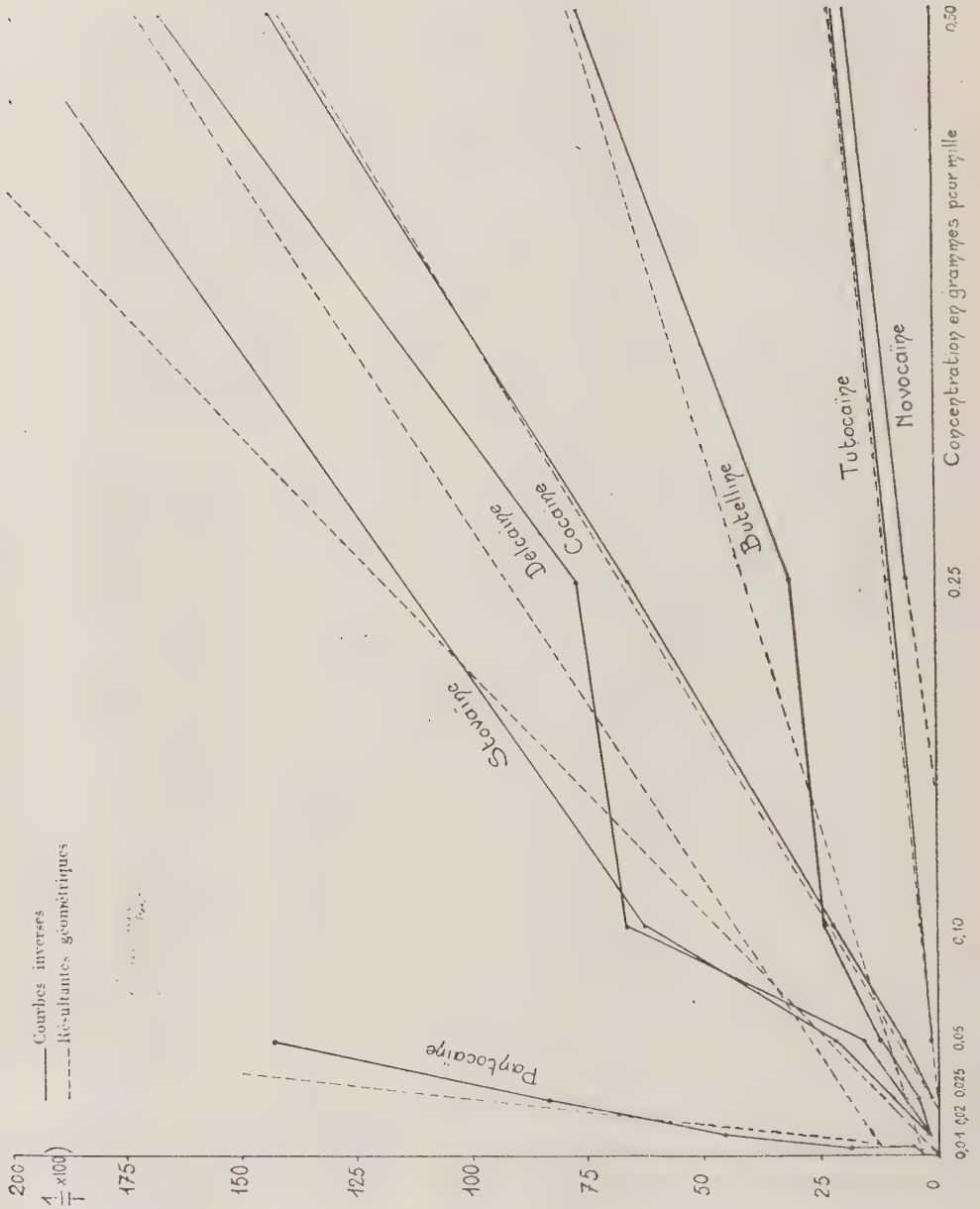
Conc. en gr. pour mille	Tutocaïne		Butelline		Pantocaïne	
	T	100/T	T	100/T	T	100/T
0,0025					25,8	3,8
0,003					24,9	4
0,004					20,1	4,9
0,0045					16,8	5,9
0,005					5,3	18,8
0,01			67,3	1,4	2,2	45,4
0,025			20,4	4,8	1,2	83,3
0,05	64,2	1,5	8,1	12,3	0,7	142,8
0,10	28,2	3,5	4,2	23,8		
0,25	10,1	9,9	3,3	30,3		
0,50	4,7	21,2	1,3	76,9		

L'examen de ces tracés montre que la pente générale des courbes décroît constamment lorsqu'on suit la série dans l'ordre suivant : pantocaïne, stovaïne-delcaïne, chlorhydrate de cocaïne-butelline, tutocaïne-novocaïne.

Ces résultats se trouvent confirmés si, dans un but d'application pratique, nous cherchons à déterminer les concentrations de ces divers sels susceptibles de provoquer l'anesthésie dans des temps égaux ou à peu près égaux.

En nous rapportant aux résultats trouvés dans nos précédents essais, il nous a été facile de déterminer les concentrations de chaque sel provoquant l'anesthésie en des temps d'environ 2,5, 5 et 10 minutes. En reprenant les essais immédiatement après avoir terminé nos premières expériences, et en utilisant les poissons d'un même lot, donc de même provenance, et les mêmes produits anesthésiques, nous nous mettons dans les conditions les plus favorables pour réduire au minimum les variations dues aux divers facteurs dont nous avons signalé l'influence.

Dans les tableaux qui suivent, nous avons fait figurer d'une part les concentrations des divers anesthésiques nécessaires pour obtenir l'état narcotique dans des temps moyens de 2,5, 5 et 10 minutes, concentrations choisies d'après les résultats antérieurs, et d'autre part les temps



COURBES XXIV

Action comparée de divers anesthésiques locaux.

Courbes inverses des courbes XXIV.

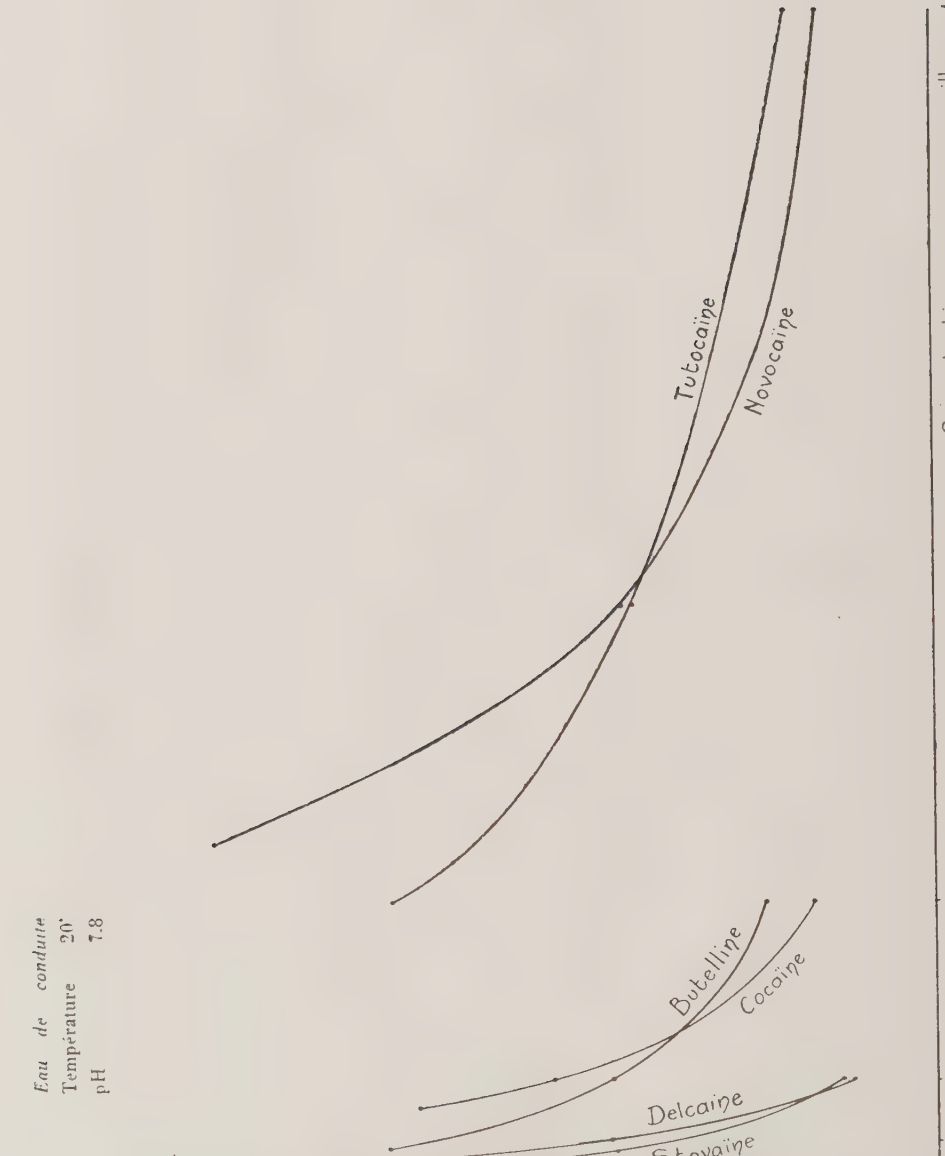
nécessaires exactement mesurés pour obtenir l'état de narcose dans ces présents essais.

TABLEAU XXVIII

Détermination de l'échelle des concentrations des divers sels anesthésiques nécessaires pour obtenir des effets similaires.

Substances anesthésiques	Concentration en gr. ° /oo	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)
	Temps moyen : 2, 5 *minutes*	
Pantocaïne	0,01	2,9
Delcaïne	0,10	1,9
Stovaïne	0,10	2.
Chl. Cocaïne	0,25	2
Butelline	0,25	2,8
Tutocaïne	1	2,4
Novocaïne	1	1,9
	Temp moyens : 5 *minutes*	
Pantocaïne	0,005	5,5
Delcaïne	0,05	5,4
Stovaïne	0,04	5,3
Chl. Cocaïne	0,10	6,4
Butelline	0,10	5,4
Tutocaïne	0,50	5
Novocaïne	0,50	5,2
	Temps moyen 10 *minutes*	
Pantocaïne	0,004	12,4
Delcaïne	0,03	9,1
Stovaïne	0,025	9,4
Chl. Cocaïne	0,075	8,7
Butelline	0,04	9,2
Tutocaïne	0,25	9,1
Novocaïne	0,30	12,1

Nous pouvons, à partir de ces données, construire les courbes « temps d'action-concentration », qui, dans la zone ainsi délimitée, seront plus précises que les précédentes. L'examen de celles-ci (courbes XXV) nous conduisent



Courbes XXV

Détermination des concentrations ayant des effets similaires.

d'ailleurs aux mêmes conclusions que celles de nos premières observations :

1°) La pantocaïne est nettement plus active que les autres anesthésiques étudiés. Ceux-ci se groupent deux à deux, et les tracés correspondant aux deux constituants d'un même groupe s'entrecroisent pour des temps d'anesthésie compris entre 3 et 5 minutes.

2°) Par ordre d'activité décroissante, les anesthésiques essayés se rangent de la façon suivante :

pantocaïne, delcaïne-stovaïne, butelline-chlorhydrate de cocaïne, tutocaïne-novocaïne, ces deux composés étant toujours nettement moins actifs que les précédents.

Nos résultats, comme ceux de F. Mercier et G. Valette, montrent la supériorité de la delcaïne sur la cocaïne, mais si on se reporte aux chiffres trouvés par ces auteurs, nous constatons des différences sensibles avec les nôtres.

C'est ainsi qu'à une concentration de 1/20.000 (0 g. 05 pour mille), ces auteurs ont trouvé que les durées nécessaires pour obtenir l'anesthésie sont de 28 minutes pour la delcaïne alors que nous trouvons 6,3 minutes pour la même concentration, et de 55 pour la cocaïne alors que nous obtenons le chiffre de 14 minutes.

De même, à une concentration de 1/40.000 (0 g. 025 pour mille), nous notons 12,6 minutes pour la delcaïne et 64 minutes pour la cocaïne alors que F. Mercier et G. Valette indiquent 45 minutes pour la delcaïne et 120 minutes pour la cocaïne.

Nous pensons qu'il est possible d'attribuer ces divergences soit à une différence de pH, soit à une différence de technique, particulièrement en ce qui concerne le choix du terme de la réaction.

b) Actions comparées du chlorhydrate de cocaïne et de la percaïne sur les épinoches.

Les résultats obtenus en comparant l'action de la percaïne et du chlorhydrate de cocaïne en solution, à pH 6,5, dans l'eau de conduite sont réunis dans le tableau XXIX.

TABLEAU XXIX

Comparaison de l'action de la percaïne et de l'action du chlorhydrate de cocaïne sur Gasterosteus aculeatus.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 6,5

	Concentration en grammes pour mille						
	1	0,50	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01
	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)						
Percaïne	0,9	1,8	2,6	6,8	8	11,9	39,3
Chl. de Cocaïne	3,9	6,7	13,3	36,1	pl. de 120		

L'examen de ces chiffres nous montre d'abord que, conformément aux observations déjà faites, l'acidification des solutions diminue la rapidité d'action du chlorhydrate de cocaïne et que, à pH égal, la percaïne est nettement plus active que le chlorhydrate de cocaïne. Cette dernière constatation ressort également de l'examen des courbes « temps d'action-concentration » (courbes XXVI). Il est à noter que, dans ce dernier cas, les poids moléculaires de la cocaïne et de la percaïne étant assez voisins, on obtient sensiblement le même graphique en portant en abscisses les concentrations moléculaires ou les poids d'anesthésiques employés. (courbes XXVI)

Enfin, l'examen des courbes inverses et de leur résultante (courbes XXVII), construites en utilisant les données du tableau XXX, montre également très nettement que, à pH 6,5, la percaïne est plus active que le chlorhydrate de cocaïne, mais que ce dernier corps a une action plus régulière.

Il nous apparaît enfin important de signaler que les symptômes qui caractérisent ce que nous avons appelé l'état narcotique ou l'état anesthésique ne se manifestent pas d'une façon identique à toutes les concentrations pour les diverses substances étudiées.

COURBES XXVI

Action comparée du chlorhydrate de cocaïne et de la percaïne.

TABLEAU XXX

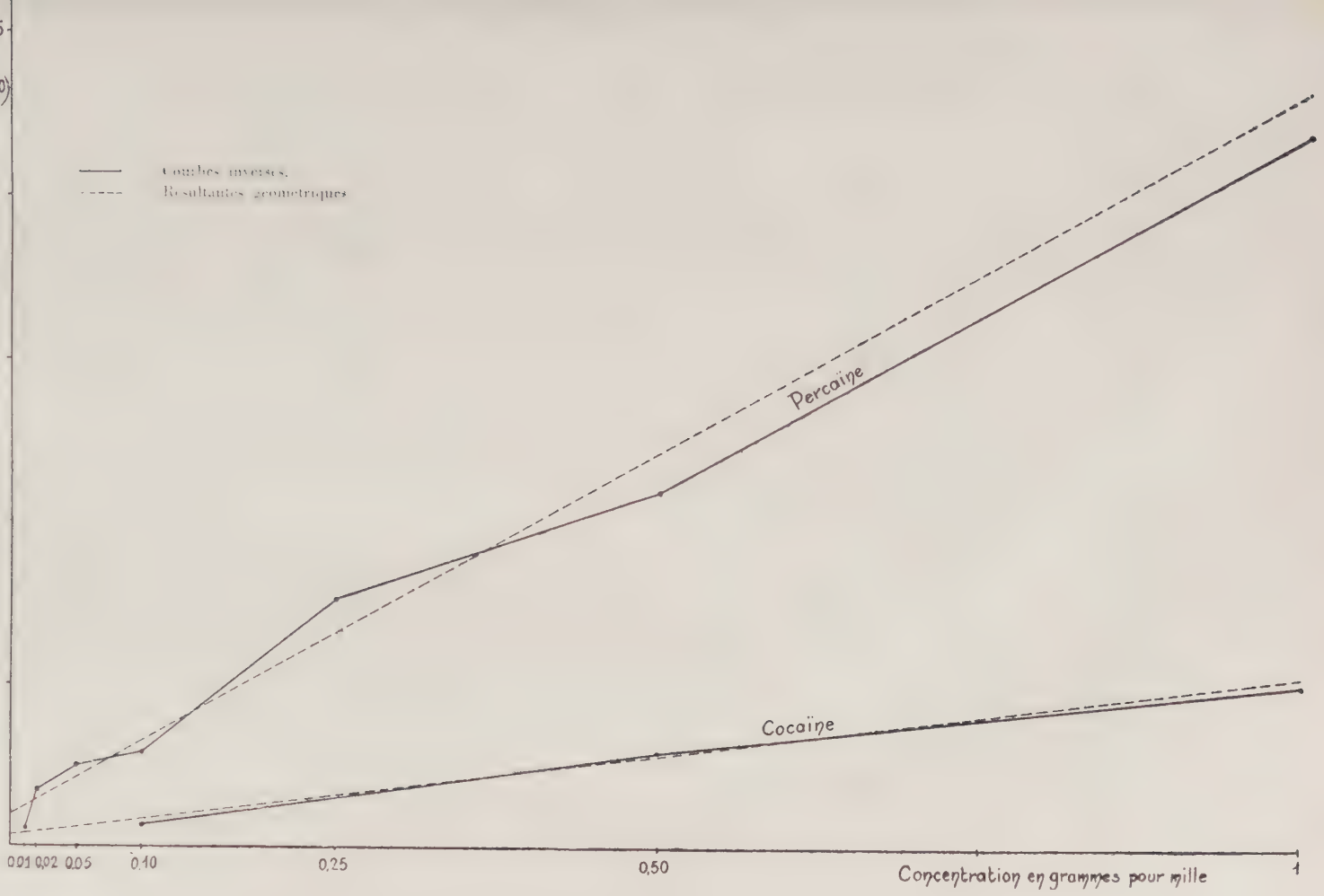
Détermination des réciproques des temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie, avec la percaïne et le chlorhydrate de cocaïne : 1/T (× 100).

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 6,5

Concentration en gr. pour mille	Percaïne		Chl. de Cocaïne	
	T	1/T × 100	T	1/T × 100
0,01	39,3	2,5		
0,025	11,9	8,4		
0,05	8	12,5		
0,10	6,8	14,7	36,1	2,7
0,25	2,6	38,4	13,3	7,4
0,50	1,8	55,5	6,7	14,9
1	0,9	111,1	3,9	25,6

En effet, l'action de ces anesthésiques provoque des réactions violentes chez les poissons. Ces réactions sont tout à fait caractéristiques avec la delcaïne et la butelline en particulier, dont l'action occasionne chez les animaux des mouvements convulsifs violents, même après la disparition de la réponse réflexe test. Les poissons semblent « shockés » par l'action de l'anesthésique, même aux faibles concentrations. Nous avons observé en outre, dans le cas de la novocaïne et de la delcaïne, une très intense pigmentation de l'épiderme des poissons ; celle-ci était moins importante mais encore nette pour la butelline, la percaïne et la pantocaïne. Il est possible que l'on puisse attribuer cette pigmentation à l'influence de substances vasodilatatrices sur les chromatophores.

Si l'on envisage la rapidité de rétablissement des animaux, une fois remis dans l'eau pure, après disparition du réflexe caractérisant l'état de narcose, on constate que, aux diverses concentrations correspondant à des temps d'anesthésie à peu près égaux, le nombre de poissons qui survivent est très variable selon la substance anesthésique envisagée.



COURBE XXVII

Action comparée du chlorhydrate de cocaïne et de la percaïne

Courbes inverses des courbes XXVI.

Nous avons groupé dans le tableau qui suit les résultats obtenus à ce sujet, au cours des essais de comparaison des divers anesthésiques effectués antérieurement.

TABLEAU XXXI

Etude de l'influence toxique de divers anesthésiques.

Substance anesthésique.	Concentration en gr. °/oo	Temps nécessaires pour l'anesthésie (mesurés en min.)	Nombre d'animaux ayant survécu (10 poissons par expér.)
Temps moyen d'anesthésie : 1 à 2 minutes.			
Delcaïne	0,10	1,5	10
Delcaïne	0,25	1,3	10
Stovaïne	0,10	1,6	10
Butelline.	0,50	1,3	0
Percaïne	0,50	1,8	0
Temps moyen d'anesthésie : 4 à 7 minutes.			
Chl. de Cocaïne	0,10	4,5	9
Stovaïne	0,05	4,5	10
Butelline	0,10	4,2	0
Percaïne	0,10	6,8	0

Nous voyons donc que pour des activités anesthésiques égales ou à peu près égales, les actions toxiques sont nettement différentes, et que même dans certains cas, les doses qui provoquent l'anesthésie en un temps plus long, donc correspondant à une activité anesthésique plus faible, ont un pouvoir toxique nettement supérieur.

II) ACTION DES ANESTHÉSIQUES LOCAUX SUR LES POISSONS "ANESTHÉSIE" OU "TOXICITÉ"

Comme tous les auteurs qui nous ont précédés, nous avons admis jusqu'ici qu'une épinoche immergée dans une solution d'un sel anesthésique était d'abord « anesthésiée »

avant d'être « intoxiquée ». Dans ces conditions nos mesures nous donnent bien le pouvoir anesthésique des corps étudiés, ce pouvoir anesthésique étant indépendant de la toxicité du produit.

Cette manière de voir se trouve confirmée par les expériences précédentes qui montrent qu'après des « anesthésies » survenant en des temps égaux, le nombre d'animaux survivant varie largement selon le corps étudié.

On peut cependant faire à cette conception un certain nombre d'objections. Tout d'abord, il peut paraître curieux de voir un anesthésique dit « local » se comporter en anesthésique « général ». Cependant, la différence entre anesthésie locale et anesthésie générale n'est pas aussi tranchée que l'on pourrait le croire. En stomatologie par exemple, la novocaïne peut être utilisée pour produire une « insensibilisation » parfaitement localisée, ou au contraire, dans le cas des anesthésies tronculaires, pour provoquer une anesthésie profonde et durable de la moitié du maxillaire. De même il est bien difficile de considérer comme « anesthésie locale » le résultat d'une injection intrarachidienne de novocaïne par exemple.

Par contre, le fait que chez les épinoches, la disparition des réflexes est précédée par une période d'agitation plus ou moins vive, avec mouvements respiratoires rapides et irréguliers et mouvements convulsifs variant avec les produits utilisés, peut laisser supposer que nous sommes en présence de phénomènes d'intoxication. On sait en effet que, chez les poissons, l'absorption de la substance anesthésique se fait au niveau des branchies, et qu'ainsi introduit le poison gagne les capillaires artériels et de là, très rapidement, le système nerveux central. Nous pourrions donc mesurer, dans nos essais, soit une simple action toxique, soit une action complexe au cours de laquelle interviendraient, dans des proportions mal déterminées, des phénomènes toxiques et des phénomènes anesthésiques ; soit enfin, dans le cas le plus favorable, une action anesthésique spécifique.

A l'appui de cette objection, nous devons en effet noter que l'ordre d'activité trouvé au moyen de notre technique, pour les différents anesthésiques étudiés, ne correspond pas exactement à celui établi par J. Régnier en se basant sur les actions anesthésiques locales exercées sur la cornée du lapin, sur les fibres sensitives ou motrices de la grenouille et sur les fibres sensitives du nerf lingual du chien. Notre classification se rapproche plutôt de celle établie par Eichholtz et Hoppe [47] en déterminant la grandeur de l'action spasmodique exercée, en injection intraveineuse, sur le rat blanc.

Pour essayer de déterminer la part qui revient, dans nos essais, à l'action anesthésique d'une part, et à l'action toxique d'autre part, nous sommes amenés à revoir rapidement les opinions des principaux auteurs qui se sont occupés de cette question et à entreprendre de nouvelles expériences.

Comme nous l'avons déjà vu, P. Régnard attribue l'état de « mort apparente » des poissons à une anesthésie des nerfs branchiaux. Celle-ci provoque l'abolition du réflexe respiratoire et la suppression des mouvements des ouïes et de la bouche. Le poisson « cesse absolument de respirer ». Nos essais confirment ceux de Régnard, au sujet de la disparition progressive des mouvements respiratoires, mais nous devons cependant signaler que, pour certains anesthésiques, et en particulier pour le chlorhydrate de cocaïne, les mouvements de la bouche et des ouïes se maintiennent un certain temps après la disparition de la réponse réflexe au pincement des nageoires.

Si nous comparons nos observations avec celles de Régnard, nous voyons que les chiffres donnés par cet auteur comme temps nécessaires aux poissons pour retrouver leur équilibre et revenir à l'état normal, une fois remis dans l'eau pure, sont, pour des concentrations égales, bien supérieurs aux nôtres. Régnard signale en effet que, des poissons immergés dans une solution à 1/2.000 sont en état de mort apparente au bout de 10 à

15 minutes. Retirés à ce moment, ils restent en état de mort apparente pendant 3 ou 4 heures et se rétablissent peu à peu. Dans nos propres essais, pour des concentrations identiques, les animaux, une fois remis dans l'eau pure, se rétablissent dans un temps allant de 30 à 60 minutes, au maximum, l'état de mort apparente ne durant pas plus de deux minutes. Ceci s'explique cependant par le fait que Régnard, dans ses essais, laissait les animaux séjourner dans les solutions anesthésiques de 10 à 15 minutes, alors que nous-mêmes ne les avons jamais maintenus plus de 3 minutes, à cette concentration.

Pour R. Adams E. K. Rideal, W. B. Burnett, R. L. Jentins et E. E. Dreger, il s'agit également d'une simple action anesthésique qui peut être extrêmement rapide, ou au contraire, incertaine et incomplète. Le retour à l'état normal, lorsque le poisson est remis dans l'eau pure, est précédé par le rétablissement des mouvements des ouïes. Pour appuyer leur opinion, les auteurs américains se basent sur le fait que des poissons « anesthésiés », puis remis dans l'eau pure jusqu'à parfaite guérison, se comportent comme des animaux neufs au cours d'un nouvel essai. Certains poissons ont ainsi été utilisés quatre ou cinq fois, ce qui prouve que les corps essayés n'exercent pas d'action toxique permanente capable de léser les cellules.

Cette observation, fort importante, a été confirmée par nos expériences. Nous avons montré en effet, que des épinoches « anesthésiées » une première fois avec du chlorhydrate de cocaïne, puis remises dans l'eau pure, redonnaient les mêmes résultats lorsqu'on les soumettait à un nouvel essai, 2 heures, 6 heures, 12 heures, 24 heures ou 48 heures après leur guérison apparente.

Enfin G. Carbonaro d'une part, F. Mercier et G. Valette d'autre part admettent également qu'il se produit une anesthésie généralisée. Pour ces derniers, en particulier, les essais effectués sur les épinoches, donnent des résultats comparables à ceux que l'on obtient en utilisant des nerfs sensitifs isolés (sciatique de la grenouille, lingual du chien).

Pour tous ces auteurs, les essais sur les poissons conduisent donc bien à la détermination du pouvoir anesthésique des corps étudiés.

Cependant, pour essayer d'écarter l'hypothèse d'une action uniquement toxique, nous allons comparer les résultats obtenus dans la mesure de l'action anesthésique, ou mieux de l'action narcotique, de nos différents produits, avec les chiffres obtenus dans des essais de toxicité pure. Si les résultats coïncident, nous sommes en droit de supposer que nous mesurons la toxicité dans les deux cas. Si au contraire les résultats diffèrent, nous ne mesurons peut-être pas seulement, avec notre technique, une anesthésie pure, mais un phénomène mixte se rapprochant de l'anesthésie.

Pour arriver à ce résultat, deux moyens se présentent à nous :

1°) Déterminer le nombre d'animaux survivants après action limitée à ce que nous avons appelé état narcotique.

2°) Laisser les poissons dans les solutions anesthésiques après obtention de la narcose, jusqu'à la mort des animaux, et comparer les temps nécessaires pour parvenir à ces deux tests.

Première méthode :

Nous avons repris les essais exposés plus haut, en plaçant, comme dans nos expériences antérieures, des séries de 10 poissons dans des solutions à des concentrations égales pour les divers produits. Nous avons noté le pourcentage des animaux qui se rétablissent dans l'eau pure où ils sont placés dès la disparition du réflexe caractérisant l'état de narcose. Sauf pour la stovaïne, à la concentration de 0 g. 25 pour mille, ou un poisson est mort le lendemain seulement, la mort des animaux est toujours survenue 60 minutes au plus après avoir été remis dans l'eau ordinaire.

Nous avons groupé dans le tableau XXXII les pourcentages des animaux qui se sont rétablis dans l'eau pure

TABLEAU XXXII

Détermination de l'action toxique des substances anesthésiques sur Gasterosteus aculeatus.

Eau de conduite. Température : 20°. pH : 7,8

Concentration en grammes pour mille	Temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie (en minutes)	Pourcentage de survie (10 animaux en expér.
	Chlorydrate de cocaïne	
0,50	1,1	7
0,25	2,5	8
0,10	5,7	10
0,05	13,7	10
	Stovaïne	
0,50	0,63	0
0,25	1,13	5
0,10	2,1	10
0,05	4,2	10
	Delcaïne	
0,50	0,6	1
0,25	1,0	5
0,10	2,6	8
0,05	5,12	8
	Butelline	
0,50	1,6	0
0,25	2,8	1
0,10	4,6	2
0,05	9,2	9

Nous voyons là encore que pour des temps sensiblement égaux, ce qui pourrait faire admettre des pouvoirs anesthésiques égaux, les proportions d'animaux qui survivent sont nettement différentes pour les divers anesthésiques. Pour des temps d'action de 1 à 1,6 minutes, sur dix animaux utilisés pour l'essai, 7 survivent après action du chlorhydrate de cocaïne, 5 résistent après immersion

dans les solutions de stovaïne et de delcaïne, et aucun animal ne supporte l'action du sulfate de butelline.

Pour des temps compris entre 2,1 à 2,8 minutes, 10 poissons sur 10 survivent après passage dans les solutions de stovaïne, 8 poissons sur 10 résistent après action de la delcaïne ou du chlorhydrate de cocaïne, 1 poisson seulement survit après action de la butelline.

Nous obtenons encore des résultats analogues pour des temps compris entre 4,2 et 5,7 minutes, le nombre des survivants étant de 10 pour le chlorhydrate de cocaïne et la stovaïne, de 8 pour la delcaïne et de 2 seulement pour la butelline.

Ces faits mettent en évidence une action toxique importante pour la butelline (3 survivants sur 30), action toxique qui va en décroissant de la delcaïne (21 survivants) à la cocaïne et à la stovaïne (25 survivants sur 30). Ils nous montrent surtout que les chiffres obtenus dans nos essais sont, dans une large mesure, indépendants de la toxicité réelle du produit.

Remarquons en outre que nous retrouvons, comme l'avait déjà constaté R. Adams que la guérison est beaucoup plus facile lorsque l'anesthésie est obtenue avec une solution diluée que lorsqu'elle est provoquée par une solution concentrée.

Deuxième méthode :

Pour mesurer la toxicité des différents anesthésiques, nous avons maintenu les animaux dans les solutions anesthésiques jusqu'à l'instant de la mort. Celui-ci a pu être noté avec assez de précision en utilisant la technique préconisée par Lopez-Lomba, qui consiste à examiner au microscope la circulation sanguine dans les capillaires des nageoires. Cette méthode présente une grande simplicité en raison de l'état de « léthargie » précédant la mort des animaux. Les poissons, en complet état de mort apparente sont saisis avec précaution entre les deux branches d'une

petite pince et placés sur une lame de verre que l'on porte sur la platine du microscope.

La circulation sanguine apparaît très nettement par l'observation de l'entraînement rapide des globules sanguins dans les capillaires de la nageoire caudale. Il n'est pas nécessaire de répéter souvent les observations, le moment de la mort caractérisé par l'arrêt total de la circulation étant toujours précédé par un ralentissement progressif et facile à observer. Avec un peu d'entraînement et d'habitude, on arrive à caractériser avec suffisamment de précision ce ralentissement en ne portant l'animal que deux ou trois fois sous l'objectif, à des intervalles de temps variant de deux à vingt minutes, selon le résultat de la précédente observation. Deux minutes au maximum séparant la dernière observation qui détermine le temps correspondant à l'arrêt de la circulation, donc à la mort de l'animal, et l'avant-dernière observation qui révélait un état de vie, l'erreur absolue dans nos mesures ne peut donc être au maximum que de deux minutes.

Ce mode opératoire est beaucoup plus simple que celui qui consiste à laisser séjourner les poissons pendant des temps croissants dans les solutions anesthésiques avant de les replacer dans l'eau pure, et à noter, dans chaque cas, le pourcentage de mortalité. Les expériences sont, dans ce cas, beaucoup plus longues et ne conduisent pas à de bons résultats, comme l'ont d'ailleurs signalé également R. Adams et ses collaborateurs.

Nous avons divisé chaque essai en deux périodes. La première correspondant à ce que nous avons appelé le temps nécessaire pour obtenir l' « anesthésie » ou la « narcose » se termine au temps T qui représente le moment de la disparition de la réponse réflexe au pincement des nageoires. Les poissons sont ensuite maintenus dans la solution anesthésique jusqu'à la mort qui se produit au temps t compté à partir du moment où le poisson a été placé dans la solution anesthésique. Les valeurs des temps t, aux différentes concentrations, représenteront la toxicité de la drogue.

Si, comme nous l'avons déjà indiqué, les rapports des temps θ des différentes drogues sont entre eux comme les rapports des temps T, nous seront conduits à admettre que le temps T ne mesure pas une action anesthésique, mais un degré de toxicité. Si par contre, les rapports entre les temps θ sont différents des rapports entre les temps T, nous serons en droit de conclure que les temps T ne mesurent pas une simple action toxique, mais une action anesthésique, ou, dans le cas le plus défavorable, une action mixte anesthésique et toxique.

Pour faciliter la lecture des résultats, nous avons choisi des concentrations donnant, d'après les résultats antérieurs, des temps T à peu près égaux pour toutes les substances anesthésiques ; les rapports entre les temps T sont, de ce fait, très voisins de un.

Les essais ont été faits dans de l'eau de conduite, à pH 7,8, sauf dans le cas de la percaïne pour laquelle le pH a été ajusté à 6,5 comme précédemment.

Nos résultats sont résumés dans le tableau XXXIII. Nous avons fait figurer dans ce tableau, les temps T et θ précédemment définis, correspondant aux concentrations choisies d'après nos résultats antérieurs, et, enfin, les rapports des temps θ aux temps T.

L'examen de ces résultats nous montre que le rapport du temps θ, nécessaire pour provoquer la mort du poisson, au temps T, nécessaire pour produire simplement la narcose, varie très largement selon les substances utilisées. Ce rapport, par exemple, passe de 4,4 à 23,6 pour un temps d'anesthésie voisin de 2 minutes, lorsque l'on passe de la percaïne à la novocaïne. Il varie encore, pour les mêmes corps, de 2,6 à 10 lorsque l'anesthésie ne s'établit qu'en 5 minutes environ.

En outre, pour un même produit, le rapport θ/T décroît très nettement lorsque la concentration diminue. Il n'existe donc pas de relation définie entre les temps nécessaires pour provoquer soit l'anesthésie, soit la mort du poisson, ce qui nous permet de dire que les résultats

donnés par notre technique ne traduisent pas une simple action toxique du corps expérimenté.

TABLEAU XXXIII

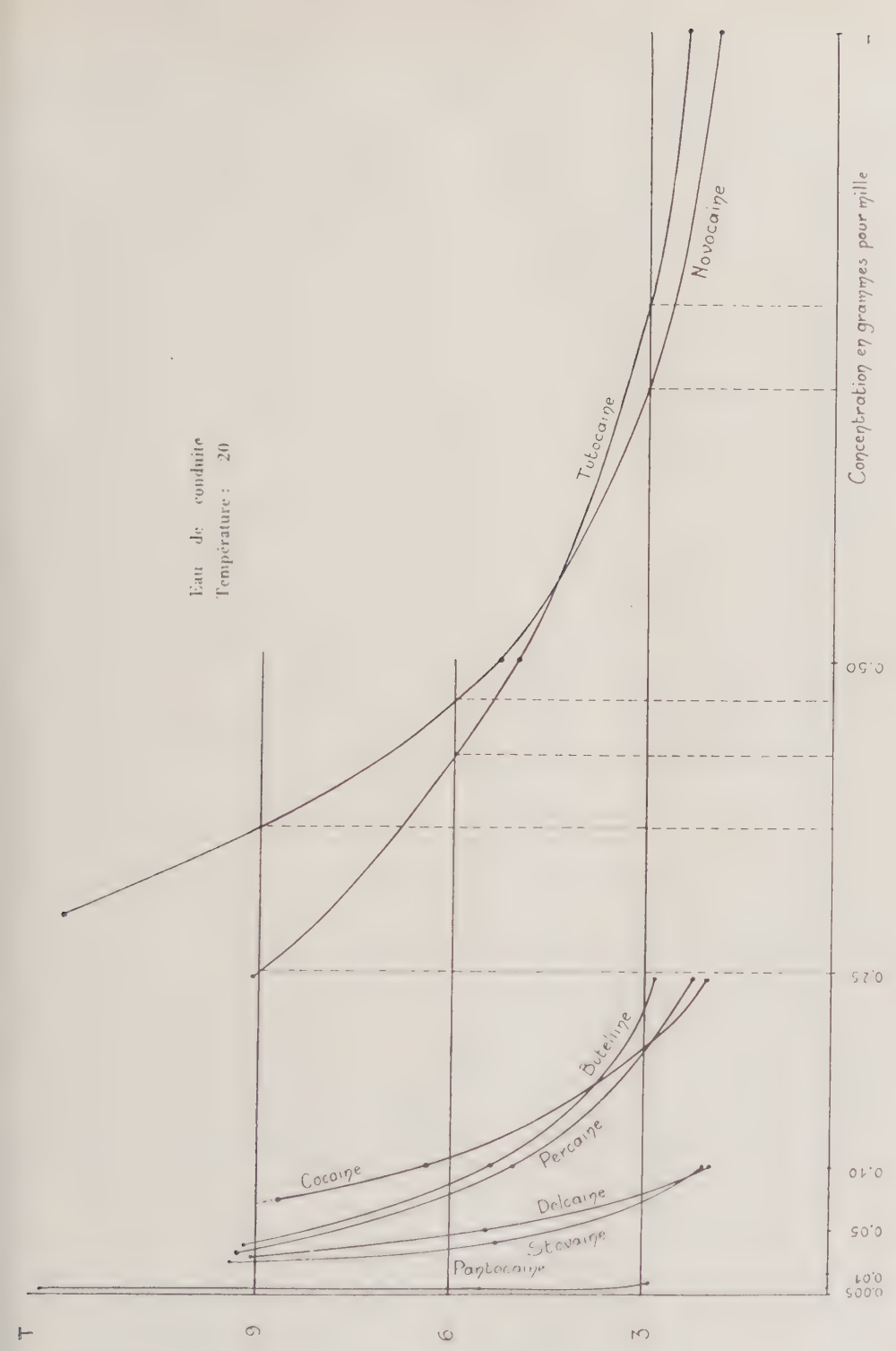
Détermination du mécanisme de l'action des substances anesthésiques sur Gasterosteus aculeatus.

Substance anesthésique	Concentrat. en g. °/oo	Temps T	Temps θ	Rapport $\frac{\theta}{T}$
	Temps T moyen : 2,5 minutes.			
Percaïne	0,25	2,2	9,9	4,4
Butelline	0,25	2,8	35	12,4
Delcaïne	0,10	1,9	33,5	17
Tutocaïne	1	2,4	35	14,1
Chl. cocaïne	0,25	2	39,5	19
Stovaïne	0,10	2	35,2	17
Pantocaïne	0,01	2,9	45	15,5
Novocaïne	1	1,9,	45,3	23,6
	Temps T moyen : 5 minutes			
Percaïne	0,10	5	13,5	2,6
Butelline	0,10	5,4	35,2	6,4
Delcaïne	0,05	5,4	37,6	6,9
Tutocaïne	0,50	5	36	7,1
Chl. cocaïne	0,10	6,4	43,2	6,6
Stovaïne	0,04	5,3	51,7	9,6
Pantocaïne	0,005	5,5	53,1	9,6
Novocaïne	0,50	5,2	52,2	10
	Temps T moyen : 10 minutes			
Percaïne	0,035	9,3	27	2,9
Butelline	0,04	9,2	77	8,3
Delcaïne	0,03	9,1	72	7,8
Tutocaïne	0,25	9,1	76	8,3
Chl. cocaïne	0,075	8,7	67,5	7,7
Stovaïne	0,025	9,4	67,5	7,1
Pantocaïne	0,004	12,4	81,5	6,5
Novocaïne	0,30	12,1	71,5	5

Pour rendre la lecture de nos résultats plus facile, nous avons construit d'une part des courbes dites « d'anesthésie », en portant en abscisse les concentrations en grammes pour mille et en ordonnée les temps T pour les différentes substances anesthésiques ; et d'autre part des courbes dites « de toxicité » en portant en abscisse les concentrations en grammes pour mille et en ordonnée les temps θ. (courbes XXVIII et XXIX). Nous avons fait figurer tous les tracés sur le même graphique tant pour les courbes « d'anesthésie » que pour les courbes de « toxicité », pour mettre nettement en évidence les positions respectives des courbes obtenues pour les diverses substances, mais, pour faciliter la lecture, et en particulier pour déterminer avec précision les temps correspondant aux temps T : 3, 6 et 9 minutes, il nous a paru utile de refaire d'autres graphiques en multipliant l'échelle des abscisses par quatre pour la percaïne, la butelline, le chlorhydrate de cocaïne, la delcaïne et la stovaïne, et par cinquante pour la pantocaïne (courbes XXX, XXXI, XXXII et XXXIII).

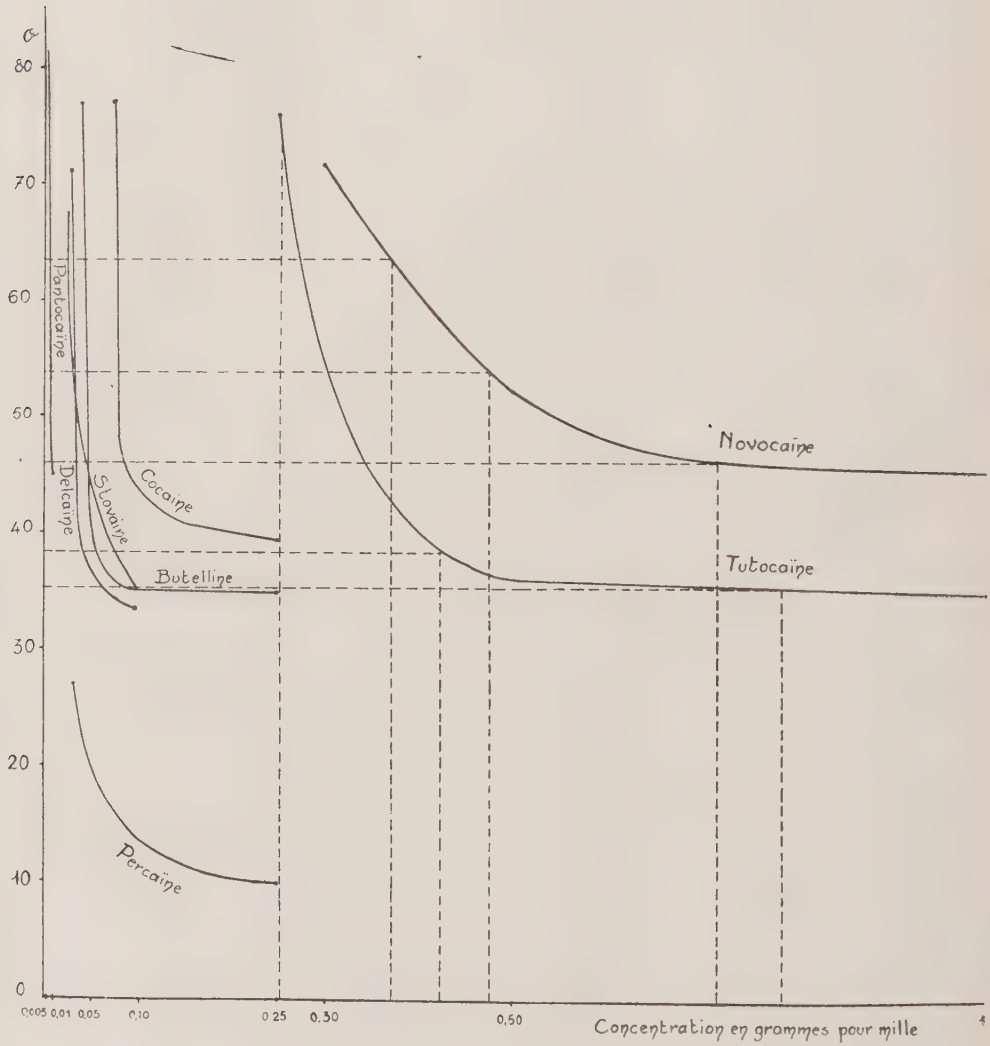
Nous voyons que la butelline et surtout la percaïne confondues avec les autres substances sur les courbes d' « anesthésie », s'en détachent nettement sur les courbes de toxicité. En outre, nous avons, en interpolant sur les courbes correspondant aux temps T, déterminé les concentrations de chaque composé provoquant l'anesthésie en des temps T parfaitement égaux, soit 3, 6 et 9 minutes. Pour la cocaïne seule, nous avons été obligés d'extrapoler très légèrement en dehors des points connus de la courbe.

A ces concentrations d'anesthésiques, correspondent sur la courbe de « toxicité », des temps θ théoriques. Les chiffres ainsi obtenus sont résumés dans le tableau XXXIV. Il faut cependant noter que, dans celui-ci, les temps θ correspondant à un temps T de 9 minutes, pour la stovaïne, le chlorhydrate de cocaïne, et la pantocaïne ne sont qu'approximatifs, ces temps se trouvant dans la partie asymptotique des courbes.



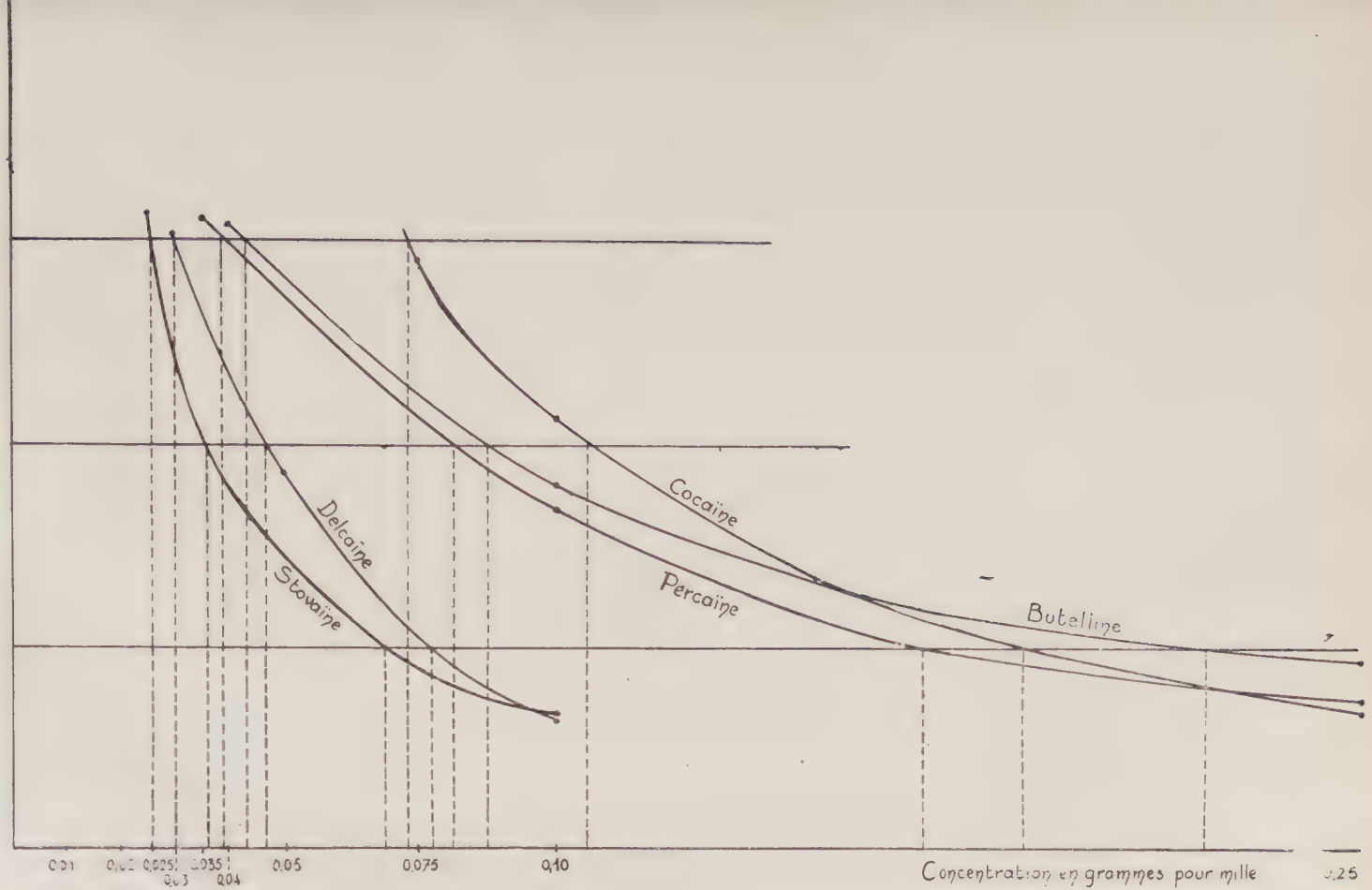
Courbes XXVIII

Courbes « d'anesthésie ».



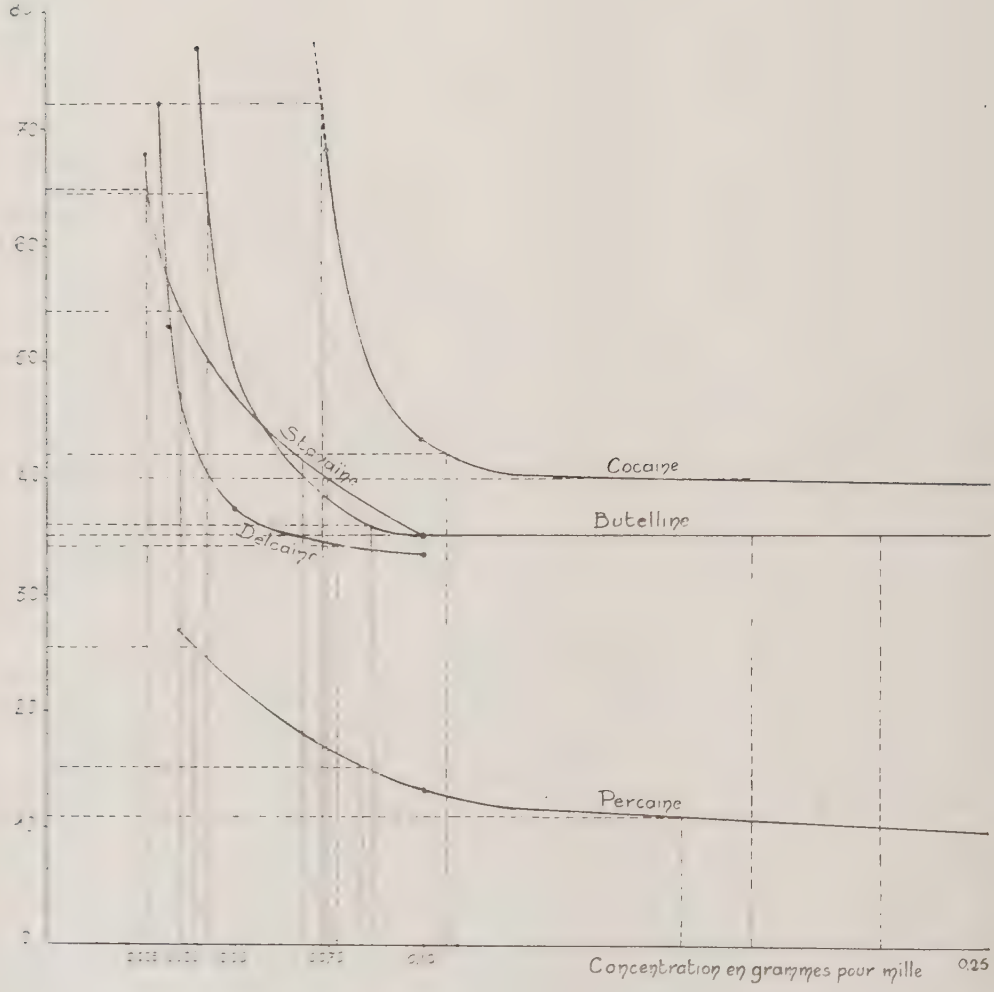
Courbes XXIX

Courbes de « toxicité ».



Courbes « d'anesthésie ».

COURBES XXX



COURBES XXXI

Courbes de « toxicité ».

TABLEAU XXXIV

Concentrations et temps θ correspondant au temps T de 3, 6 et 9 minutes.

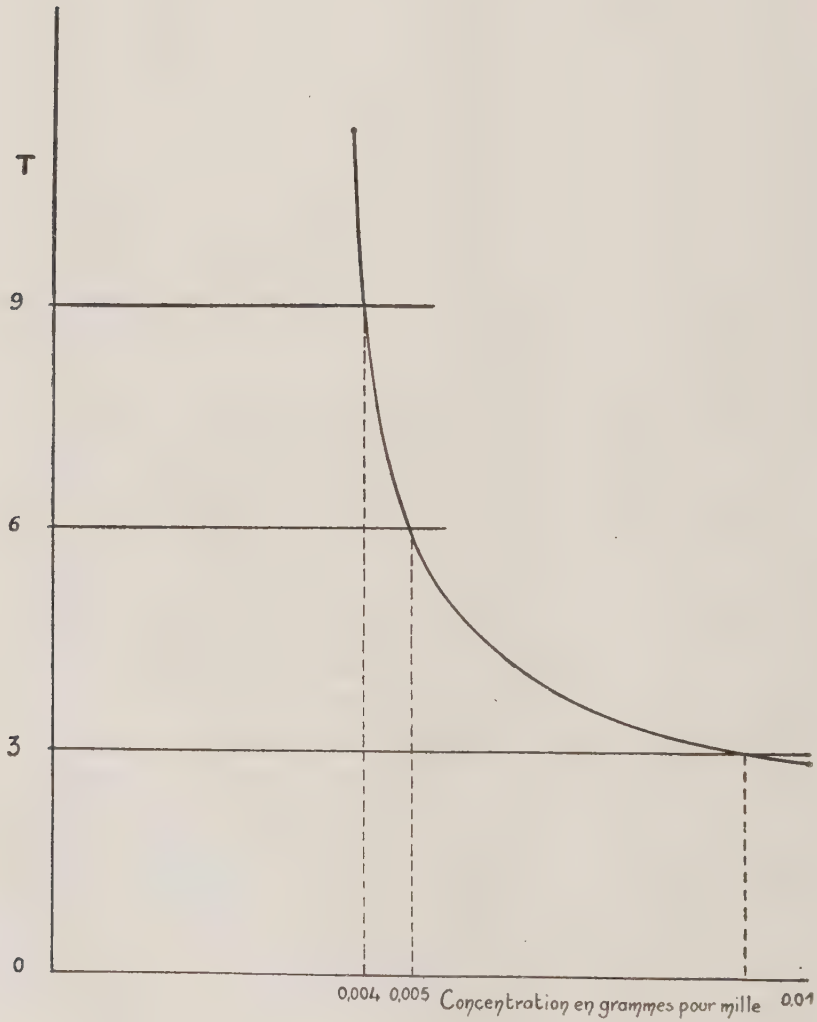
Substances anesthésiques	T = 3 min.		T = 6 min.		T = 9 min.	
	Conc. g. °/oo	θ correspondant	Conc. g. °/oo	θ correspondant	Conc. g. °/oo	θ correspondant
Percaïne	0,169	11	0,081	15,2	0,039	25,6
Delcaïne	0,077	34,2	0,046	38	0,03	72
Butelline	0,222	35,1	0,085	36	0,044	64,4
Tutocaïne	0,785	35,4	0,425	38,4	0,255	74
Stovaïne	0,069	41,2	0,036	54,3	0,026	64,8
Chl. de cocaïne	0,186	39,8	0,106	42	0,073	72
Novocaïne	0,715	46,2	0,465	54	0,37	63,5
Pantocaïne	0,095	45,2	0,0048	54,5	0,0042	67,2

Pour faciliter la lecture de ces résultats nous avons, sur un même graphique, porté en ordonnée, en face du nom de chaque anesthésique étudié, les temps θ correspondant respectivement à des temps T égaux à 3, 6 et 9 minutes. (courbe XXXIV)

Les tracés obtenus en joignant les points représentatifs ainsi déterminés ne sont pas parallèles à l'axe des x, ce qui nous montre une fois de plus qu'il n'y a pas de relation nette entre le « temps nécessaire pour provoquer l'anesthésie » tel que nous l'avons déterminé et le « temps nécessaire pour provoquer la mort de l'animal ». Mais nous voyons de plus que, pour un même effet thérapeutique (production de l'état de narcose), la marge de sécurité varie largement suivant l'anesthésique employé. Un poisson peut séjourner longtemps dans une solution de novocaïne sans être intoxiqué tandis que la mort survient assez rapidement si on l'abandonne dans une solution de percaïne par exemple.

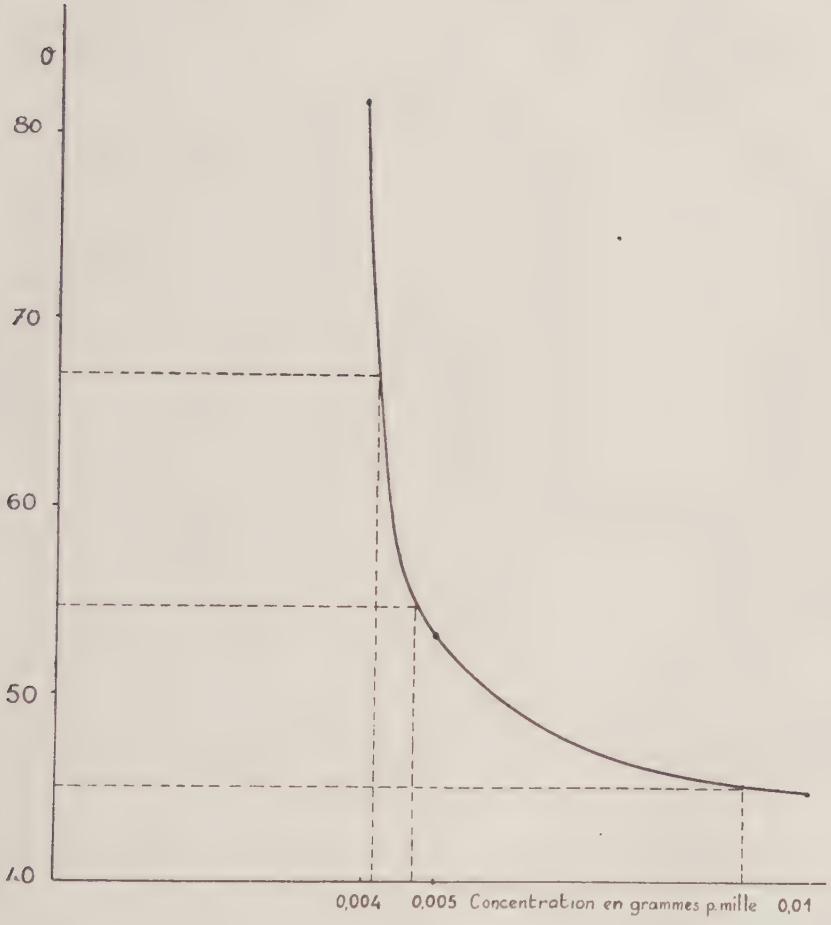
Si nous n'attachons pas trop d'importance à la courbe correspondant aux temps T égaux à 9 minutes, courbe

qui, ainsi que nous l'avons vu, contient des points difficiles à déterminer exactement, les anesthésiques se rangent, par ordre de toxicité décroissante, de la façon suivante : percaïne, butelline, delcaïne, tutocaïne, chlorhydrate de cocaïne, stovaïne-pantocaïne, novocaïne.



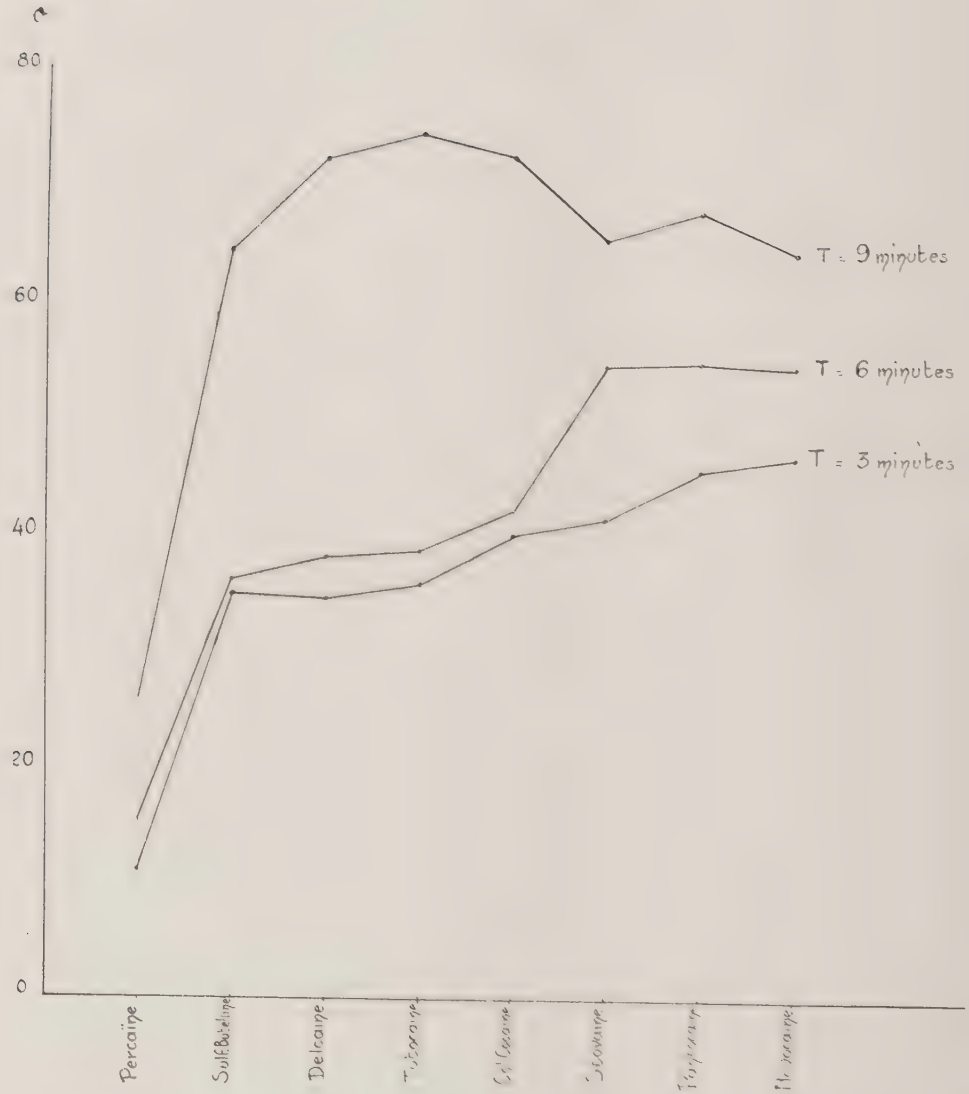
COURBE XXXII

Courbe « d'anesthésie » de la pantocaïne.



COURBE XXXIII

Courbe de « toxicité » de la pantocaïne.



COURBES XXXIV

De tous ces résultats, pouvons-nous conclure que les temps T mesurent toujours une anesthésie pure ? Nous ne le pensons pas.

Il ne faut en effet pas perdre de vue que, placés dans les diverses solutions anesthésiques, les poissons réagissent d'une manière variable et que, remis dans l'eau pure, certains meurent, d'autres au contraire, se rétablissent.

Lorsque une anesthésie est suivie immédiatement ou très rapidement de la mort, il est certain que l'action exercée est bien voisine d'une action toxique. Il en est d'ailleurs malheureusement parfois ainsi en médecine humaine.

Nous pensons pour notre part que la pénétration des anesthésiques à travers l'épithélium branchial provoque l'anesthésie locale des nerfs branchiaux, d'où ralentissement progressif des mouvements des ouïes et de la bouche, et que en outre, l'absorption peut se faire aussi par toute la surface du corps, comme l'indique M. Launoy. Mais, lorsque la substance anesthésique a pénétré dans la circulation générale, elle atteint directement les centres nerveux par les capillaires artériels et il est alors fort probable que les deux phénomènes anesthésique et toxique superposent leur action.

Aux fortes concentrations, la pénétration massive du produit toxique jusqu'aux centres nerveux expliquerait la mortalité plus grande avec les substances les plus toxiques pour les poissons. Aux plus faibles concentrations par contre, les phénomènes d'anesthésie périphérique domineraient et la pénétration jusqu'au système nerveux central se ferait à dose trop faible pour que l'action toxique observée aux fortes concentrations puisse se manifester, sauf pour les corps très toxiques pour les poissons comme la percaïne et la butelline.

Nous avons pu en outre observer les différences de réaction des poissons vis-à-vis des divers anesthésiques. Dans les solutions de cocaïne, les animaux présentent les symptômes généraux que nous avons décrits : agitation, perte d'équilibre, immobilité, aucune pigmentation de la

peau, au contraire même une décoloration sensible. Après T, les animaux sont immobiles, les mouvements de la bouche et des ouïes se maintiennent un certain temps, leur disparition est progressive.

Avec la novocaïne, les phénomènes sont les mêmes qu'avec la cocaïne jusqu'au temps T, exception faite pour la pigmentation qui est intense. Après T, les animaux sont en état de mort apparente, les mouvements de la bouche et des ouïes étant nuls ou si faibles, que l'on ne peut les observer.

Avec la stovaïne, après T, les poissons sont rapidement aussi en état de mort apparente.

La delcaïne provoque par contre, avant la disparition du réflexe test, des réactions bien différentes : les poissons sont en effet secoués de sursauts brusques et violents qui continuent à se manifester après l'anesthésie. Ils sont fortement pigmentés. En outre, au lieu de se coucher sur le flanc au fond du récipient, les animaux sont arqués, raides, la bouche reste ouverte, les ouïes écartées. La mort semble à priori certaine, cependant cet état peut durer très longtemps avant que l'on puisse constater l'arrêt de la circulation sanguine. Dans un cas tout à fait caractéristique, la disparition du réflexe test ayant eu lieu au bout de 35 minutes, un poisson est resté 65 minutes dans cet état de mort apparente sans toutefois que la circulation sanguine ait cessé.

Dans les solutions de pantocaïne, de percaïne et de butelline, les animaux sont légèrement pigmentés alors qu'ils ne le sont pas du tout dans les solutions de tutocaïne.

Toutes ces observations sont à l'appui de notre hypothèse selon laquelle les substances anesthésiques n'exerceraient pas une seule action anesthésique.

Les expériences que nous venons de relater nous conduisent finalement aux conclusions suivantes :

1°) Notre technique nous permet une fois de plus de mettre en évidence la différence d'activité des succédanés de la cocaïne que nous avons étudiés.

En ce qui concerne le « pouvoir anesthésique », nous avons pu classer ces substances de la manière suivante par ordre décroissant d'activité : pantocaïne, delcaïne-stovaïne, cocaïne-butelline, novocaïne-tutocaïne, la pantocaïne étant nettement plus active et la novocaïne et la tutocaïne étant nettement moins actives que les autres sels. La delcaïne et la stovaïne d'une part, le chlorhydrate de cocaïne et la butelline d'autre part, et enfin la novocaïne et la tutocaïne ont, deux à deux, des activités similaires et il est difficile de les différencier, celles qui sont légèrement plus actives aux fortes concentrations l'étant légèrement moins aux faibles concentrations.

En ce qui concerne la percaïne, il nous est impossible de la faire figurer dans l'échelle de comparaison des autres sels en raison de son insolubilité au pH 7,8 adopté pour les essais des autres substances anesthésiques. Une simple comparaison par rapport au chlorhydrate de cocaïne, à un pH plus acide, nous permet de conclure que la percaïne est, dans la zone sensible des essais, quatre à cinq fois plus active que la cocaïne pour les poissons.

2°) Grâce à l'utilisation d'organismes vivants, il nous a été possible de constater que les différents sels étudiés possèdent pour les poissons une certaine toxicité, souvent assez marquée, comme dans le cas de la percaïne et de la butelline, ce qui se manifeste par la présence chez les animaux, au cours de « l'anesthésie », et pour certaines concentrations, de phénomènes anormaux : respiration saccadée et irrégulière, mouvements convulsifs, etc... le pourcentage de guérison après transfert dans l'eau ordinaire étant quelquefois très faible ou nul.

La question qui se posait alors était de savoir si ce que nous avions mesuré comme « action anesthésique » ou « action narcotique » n'était pas tout simplement une action toxique ou un mélange des deux actions toxique et anesthésique.

Nos expériences et la comparaison de nos résultats avec ceux d'autres auteurs nous ont amené à conclure que

les mesures effectuées ne correspondaient pas à une seule action toxique, mais probablement à un phénomène mixte d'anesthésie et de toxicité, celle-ci exerçant surtout son action aux fortes concentrations. L'anesthésie serait une anesthésie locale des nerfs branchiaux, l'absorption de la substance se faisant en outre par toute la surface de la peau. Aux fortes concentrations, le sel anesthésique, en atteignant les centres nerveux par les capillaires artériels, exercerait son action toxique.

Cependant il apparaît que la méthode que nous avons utilisée permet une rapide comparaison de l'activité des substances anesthésiques. Cette comparaison est facilitée si l'on traduit les résultats en utilisant la méthode préconisée par l'auteur américain Ed. Powers consistant à tracer les « courbes inverses » des hyperboles obtenues avec les chiffres correspondant aux temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie.

Le simple examen de l'inclinaison des droites ainsi obtenues par rapport à l'axe des x, permet d'apprécier très rapidement la différence d'activité de plusieurs anesthésiques.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons mis au point une méthode de comparaison des anesthésiques locaux permettant l'étude de plusieurs succédanés du chlorhydrate de cocaïne.

Cette technique consiste à utiliser des poissons, réactif biologique vivant, dont l'emploi a été préconisé par de nombreux auteurs pour l'étude pharmacodynamique de diverses drogues : toxiques, narcotiques, et par quelques-uns d'entre eux, en particulier par des auteurs américains, pour l'étude d'anesthésiques locaux.

Dans un PREMIER CHAPITRE nous avons réuni les données que nous apportent les travaux antérieurs ayant utilisé les poissons comme test biologique. L'analyse de ces travaux, l'examen des différentes techniques utilisées et des facteurs qui les conditionnent nous ont permis de tirer des indications qui nous serviront à synthétiser une technique tenant compte d'une part des conclusions des travaux antérieurs et d'autre part de nos essais personnels.

Notre DEUXIÈME CHAPITRE est consacré à la mise au point de cette technique, et à l'étude du chlorhydrate de cocaïne.

Nous avons étudié l'influence d'un grand nombre de facteurs : espèce, saison des essais, taille et poids des animaux, volume du liquide et dimension des récipients, nature de l'eau, température et réaction des solutions.

Ces essais nous ont conduits aux conclusions suivantes :

1°) Les poissons possédant une résistance tout à fait variable selon l'espèce, celle-ci une fois choisie, il est important de la maintenir constante pour tous les essais. Pour notre part nous avons utilisé les épinoches, *Gaste-*

rosteus aculeatus, poisson de rivière de petite taille qu'il est facile de se procurer et de conserver au laboratoire.

2°) La taille et le poids des animaux n'ont pas d'influence sur les résultats et nous avons indifféremment utilisé des animaux de dimension variant de deux à six centimètres.

3°) Il est important d'effectuer simultanément les essais comparatifs de plusieurs corps, la résistance des animaux variant avec la saison et le frai et probablement avec d'autres facteurs mal déterminés.

4°) Le rapport de la surface au volume des récipients jouant un rôle important dans les phénomènes respiratoires des poissons, nous avons choisi des récipients où l'aération et le volume du liquide sont suffisants pour permettre sans inconvénient le séjour prolongé des animaux.

5°) La nature de l'eau utilisée pour effectuer les solutions a une influence certaine. L'eau distillée en effet est nocive pour les poissons dans un temps allant de 12 à 60 heures. Cependant, n'ayant dans aucun cas pu observer le moindre trouble avant au moins six heures d'immersion, nous avons jugé que cette toxicité pouvait être négligée dans les expériences de très courte durée.

6°) La température du milieu où ils vivent joue un rôle important sur la physiologie des poissons. On peut observer, chez les épinoches, une agitation intense lorsqu'on les transvase dans un milieu de température différente. D'autre part, en élevant progressivement la température du milieu, on constate que lorsque l'on dépasse la température de 25°, les poissons présentent des troubles qui aboutissent à la mort dans un état de « rigidité absolue » dans un temps compris entre deux et huit heures.

Ces constatations nous ont conduits à admettre la nécessité d'une accoutumance préalable à la température des essais pendant un certain temps que nous avons fixé à 24 heures.

7°) L'acidité ou l'alcalinité du milieu est sans action nocive pour les poissons, dans une zone comprise entre pH 4,5 et pH 9,5.

Dans ce même chapitre, après avoir déterminé l'influence de ces divers facteurs, nous avons étudié l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les épinoches. Nous avons tout d'abord observé les phénomènes qui caractérisent cette action : agitation, perte de l'équilibre, torpeur succédant à l'agitation, disparition des réponses réflexes à des excitations mécaniques (coup porté sur la table, frôlement des nageoires avec un agitateur, pincement des nageoires avec une pince métallique) ; enfin, « mort apparente » de l'animal. C'est la disparition de toute réponse réflexe au pincement des nageoires caudale et dorsale que nous avons choisie comme terme de la réaction. C'est ce test qui nous est apparu le plus constant et le plus fidèle.

Nos expériences ont ensuite montré qu'il n'existe pas chez les poissons de phénomènes d'accoutumance au chlorhydrate de cocaïne, des résultats similaires étant obtenus avec des poissons neufs et avec des poissons ayant déjà subi l'action de cet anesthésique.

Nous avons alors déterminé l'influence des différents facteurs sur l'activité du chlorhydrate de cocaïne pour les épinoches. Nos expériences nous conduisent aux conclusions suivantes :

1°) La température exerce une influence considérable sur le pouvoir anesthésique du chlorhydrate de cocaïne. Une élévation de température l'augmente très fortement, soit en favorisant la pénétration, soit en augmentant la réceptivité des cellules sensibles. Il est donc apparu comme nécessaire d'assurer la constance de la température par un système régulateur approprié.

2°) La réaction du milieu a, elle aussi, une très grande influence sur la valeur de l'action anesthésique, un déplacement de la réaction vers l'alcalinité favorise l'action du chlorhydrate de cocaïne, l'acidité, par contre, est nettement défavorable.

Ces résultats viennent confirmer une fois de plus ceux déjà obtenus par J. Régnier et ses collaborateurs en utilisant de nombreuses autres techniques.

Il est possible que l'on puisse expliquer l'influence de la réaction sur l'activité de ce sel anesthésique par la superposition de deux phénomènes qui agiraient dans le même sens : d'une part, l'alcalinisation du milieu faciliterait la pénétration des substances dissoutes à travers l'épithélium branchial, en solubilisant le mucus ; d'autre part, les cellules réceptrices seraient plus sensibles à l'action de l'anesthésique présenté en solution alcaline.

Ces observations mettent en évidence la nécessité de vérifier la constance du pH pour tous les essais concernant ce sel anesthésique.

3°) L'activité du chlorhydrate de cocaïne dépend enfin de la concentration des solutions. La courbe qui traduit les résultats, obtenue en portant en abscisses les concentrations et en ordonnées les temps nécessaires pour obtenir la disparition du réflexe test, se rapproche d'une hyperbole. Les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie diminuent lorsque la concentration augmente, mais ils ne sont pas inversement proportionnels à la concentration.

Les observations précédentes nous ont en outre permis de fixer comme limites de la zone des temps utilisables pour nos essais un temps minimum de 0,5 minutes et un temps maximum de 120 minutes, limites au delà desquelles les mesures perdent leur précision.

4°) Des essais comparatifs de l'activité du chlorhydrate de cocaïne en solution dans l'eau de conduite et dans l'eau distillée nous montrent que la nature de l'eau ne modifie pas d'une manière sensible l'action de ce sel sur les épinoches, si l'on a soin d'amener à un même pH les solutions effectuées dans de l'eau de conduite et dans l'eau distillée.

Dans un TROISIÈME CHAPITRE, nous avons entrepris l'étude des activités comparées de différents sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol et du chlorhydrate de cocaïne.

1°) Comme pour le chlorhydrate de cocaïne, l'élévation de température des solutions de chlorhydrate, de phénylpropionate et de citrate de paraaminobenzoyldiéthylami-

noéthanol, favorise leur action, mais l'influence de ce facteur se fait plus fortement sentir sur l'activité des sels de novocaïne que sur celle du chlorhydrate de cocaïne.

2°) Un déplacement vers l'acidité des solutions a une action très défavorable sur l'activité du chlorhydrate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, l'alcalinité a, au contraire, une action favorable, mais comme pour le chlorhydrate de cocaïne, les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie ne sont pas inversement proportionnels à la concentration en ions H.

3°) Pour des concentrations moléculaires équivalentes, la novocaïne est de neuf à treize fois moins active que la cocaïne.

La plus grande activité de la cocaïne est confirmée par l'examen des « courbes inverses » tracées d'après la technique d'Ed. B. Powers. On peut en effet constater que la pente de la droite correspondant au chlorhydrate de cocaïne est supérieure à celle de la droite correspondant à la novocaïne, ce qui traduit une plus grande activité.

4°) En solution dans l'eau de conduite, à pH 7,8, les sels de sodium des acides chlorhydrique, phénylpropionique, citrique et gluconique sont dépourvus de toute toxicité, en 8 heures, pour les épinoches, à des concentrations équivalentes, et même 2,5 fois plus fortes que celles des sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol qui seront étudiés.

Des concentrations de chlorhydrate et de gluconate de sodium qui s'étaient montrées parfaitement inoffensives dans l'eau de conduite, à pH 7,8 le sont aussi dans l'eau distillée, à pH 6,5. Par contre, des concentrations de phénylpropionate et de citrate de sodium non toxiques à pH 7,8 dans l'eau de conduite, provoquent, chez les épinoches, à pH 6,5, dans l'eau distillée, des troubles très nets. Ces troubles ne surviennent cependant qu'au bout de temps supérieurs à deux heures, alors que des concentrations équivalentes des sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol des mêmes acides provoquent l'anesthésie

en moins de vingt minutes. Il apparaît donc que l'on ne peut imputer l'action des sels anesthésiques sur le poisson à la toxicité du radical acide correspondant.

5°) L'acide qui salifie la base joue un rôle important dans l'activité de la drogue. Le phénylpropionate est nettement plus actif que le chlorhydrate qui est lui-même plus actif que le citrate et le gluconate.

Les essais effectués dans l'eau distillée donnent des résultats parallèles à ceux obtenus dans l'eau de conduite. Mais les différences constatées entre les divers sels, sont plus grandes dans l'eau distillée de pH 6,5 que dans l'eau ordinaire de pH 7,8.

C'est ainsi que, selon les concentrations, le phénylpropionate de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol est de 1,18 à 1,73 fois plus actif que le chlorhydrate, dans l'eau de conduite, et de 1,73 à 2,10 fois plus fort dans l'eau distillée.

Inversement le citrate est de 1,18 à 1,44 fois moins actif que le chlorhydrate dans l'eau ordinaire, et de 1,47 à 2,27 fois plus faible dans l'eau distillée.

Enfin, le gluconate est de 1,03 à 1,34 fois moins actif que la novocaïne officinale dans l'eau de conduite, et de 1,57 à 1,91 fois moins fort dans l'eau distillée.

Ces constatations sont confirmées, là encore, par l'examen des « courbes inverses » qui permet de classer les sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol par ordre d'activité décroissante de la manière suivante : phénylpropionate, chlorhydrate, citrate-gluconate.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par J. Régnier et ses collaborateurs, grâce à des techniques fort différentes.

Les conclusions de notre QUATRIÈME CHAPITRE, consacré à l'étude de l'action comparée de divers succédanés de la cocaïne et au mécanisme de cette action sur les épinoches, sont les suivantes :

1°) Les divers sels anesthésiques étudiés ont des activités différentes vis-à-vis des poissons. On peut les classer

par ordre d'action décroissante, de la manière suivante : pantocaïne, delcaïne-stovaïne, chlorhydrate de cocaïne-butelline, tutocaïne-novocaïne ; la pantocaïne étant nettement plus active et la novocaïne et la tutocaïne moins actives que les autres sels.

La percaïne ne peut, par suite de son insolubilité au pH 7,8, utilisé pour l'essai des autres sels, figurer dans cette échelle de comparaison. Son action est, à un pH plus acide et dans la zone sensible des essais, quatre à cinq fois supérieure à celle du chlorhydrate de cocaïne.

Tous ces résultats sont nettement mis en évidence grâce aux courbes d'allure hyperbolique obtenues en portant en abscisse les concentrations, et en ordonnée les temps nécessaires pour obtenir l'anesthésie, et aussi grâce aux « courbes inverses ».

2°) Les différents sels anesthésiques sont pourvus d'une certaine toxicité pour les poissons, et nos recherches permettent de conclure que si leur action n'est pas uniquement anesthésique ou narcotique, comme différents auteurs et nous-même l'avons considéré, elle n'est pas non plus une action purement toxique, la toxicité étant surtout appréciable aux fortes concentrations. Il s'agit donc très probablement d'une action complexe : les substances anesthésiques exerceraient leur action sur les nerfs branchiaux, et pénétreraient en outre par toute la surface de la peau. La drogue, en atteignant les centres nerveux par les capillaires artériels exercerait alors une action toxique, surtout aux fortes concentrations. S'il a été impossible d'écarter, à la suite de nos recherches, l'idée de l'influence toxique de ces sels, il se révèle que cette technique présente néanmoins de grands avantages pour une étude systématique et particulièrement pour une étude comparative des anesthésiques locaux.

Cette technique s'est en effet montrée très sensible et permet d'évaluer la force d'un anesthésique à des concentrations beaucoup plus faibles que ne le permet toute autre méthode. En outre, l'utilisation d'un grand nombre d'animaux permet d'avoir des mesures assez précises.

Une fois les conditions expérimentales bien définies, les causes d'erreur ont une part relativement faible, les résultats présentant une grande régularité.

Enfin, et ce point de vue a son importance, ces essais peuvent être réalisés au laboratoire avec un matériel peu encombrant et peu onéreux.

Nos résultats viennent en général confirmer ceux de J. Régnier et ses collaborateurs, concernant les mêmes substances, et utilisant des techniques variées. Il apparaît qu'il est intéressant, si l'on veut avoir une vue d'ensemble aussi complète que possible sur l'action comparée de plusieurs anesthésiques, d'utiliser un grand nombre de méthodes, tant en ce qui concerne les réactifs utilisés que le mode de pénétration des corps étudiés.

Vu :
Le Président de la Thèse,
J. REGNIER

Vu :
Le Doyen,
A. DAMIENS

Vu et permis d'imprimer,
Paris, le 5 novembre 1945
G. ROUSSY

BIBLIOGRAPHIE

1 — Adams (R.), Rideal (E. K.), Burnett (W.-B.), Jentins (R. L.), and Dreger (E.E.) Chemical constitution, physiological action and physical properties in a series of alkylparaaminobenzoates. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, 1758.

2 — Autenrieth (W.). — Laboratory manual for the detection of poisons and powerful drugs. 6th Am. ed. from 5 th Germ. ed. 1928.

3 — Barnes (O. A.) and Adams (R.). — Piperidyl and substituted piperidylalkyl paraaminobenzoates. *Journal of Amer. Chem. Soc.* 1927, **49**, 1307.

4 — Bachrach (E.). — De l'action combinée de la strychnine et de la morphine sur le système nerveux des poissons. *Bul. Sc. Pharm.* 1928, 35, 15.

5 De quelques facteurs qui conditionnent l'intoxication des poissons par certains sels minéraux. *C. R. Soc. Biol.* 1921, **84**, 357.

6 — Baudin (L.). — Action de la tricaïne sur la consommation d'oxygène. — Carassius aureatus. *C. R. Soc. Biol.* 1932, **109**, 731.

7 Perte de la sensibilité à la dépression chez le poisson anesthésié à la tricaïne. *C. R. Soc. Biol.* 1939, **110**, 151.

8 Respiration du poisson (Carassius aureatus) anesthésié à la tricaïne et soumis à une élévation brusque de température. *C. R. Soc. Biol.* 1939, **110**, 135.

9 - Binet (L.). — La réanimation. — *Presse médicale*, 1933, n° 15, 289.

10 Le poisson réactif biologique. — *Six conférences de physiologie*, 1935, Masson et Cie, Ed. Paris.

11 Expériences sur les poissons — *An. Inst. Océanogr.* 1938, **18**, 1 à 30.

12 Nouvelles expériences sur les poissons. Déductions pratiques sur le traitement de diverses intoxications. « *Sciences* » (Assoc. Franc. pour l'avancement des sciences », 28, rue Serpente. Paris. — n° 38.

13 Binet (L.) et Achard (Ch.). — Les effets de l'hyposulfite de sodium sur l'intoxication par le cyanure de potassium. *C. R. Ac. Sciences.* 1934, **198**, 222.

14 Binet (L.), Arnaudet (A.) et Cardot (H.). — Survie du centre respiratoire du poisson, en fonction de la composition du liquide qui perfuse. *Journ. Physio, Patho. génér.* 1930, **28**, 50.

15 Influence de la concentration des ions H sur le fonctionnement d'un centre nerveux d'après les expériences de perfusion de la tête isolée des poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1929, **102**, 773.

16 - Binet (L.) et Cardot (H.). — Sur la survie de la tête isolée des poissons avec ou sans perfusion. *Journ. Physio. Patho. Génér.* 1929, **27**, 250.

17 — Sur quelques réflexes respiratoires chez les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1927, **97**, 1276.

18 — Binet (L.), Cardot (H.), Arnaudet (A.) et Bonnet (V.). — Réanimation par la caféine du centre respiratoire inhibé par le chloroforme. Etude sur le poisson. *C. R. Soc. Biol.* 1933, **107**, 470.

19 — Binet (L.). et Jaulmes (Ch.). — Expériences sur le poisson rouge.— L'intoxication uranique et sa thérapeutique bicarbonatée. *La Médecine*, 1937, **18**, 690.

20 — Binet (L.) et Morin (G.). — Contribution à l'étude de l'hyperthermie et de l'asphyxie (recherches sur les poissons). *C. R. Ac. Sciences.* 1934, **198**, 222.

21 — Résistance des poissons aux substances toxiques suivant diverses conditions expérimentales. — Action sensibilisatrice du thermol. *C. R. Soc. Biol.* 1933, **114**, 608.

22 — Réanimation des poissons soumis au « coup de chaleur ». *C. R. Soc. Biol.* 1933, **114**, 457.

23 — Accoutumance à la chaleur chez les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1933, **114**, 677.

24 — Action de la chaleur sur les poissons. *Journ. Physio. Patho. Génér.*, 1934, **32**, 372.

25 — Binet (L.) et Perel (L.). — L'intoxication saturnine expérimentale. Essais de neutralisation. *C. R. Soc. Biol.* ; 939, **131**, 956.

26 — Binet (L.) et Zamfir (D.). — Intoxication par le tabac et la nicotine. — *Bull. et Mem. de la Soc. Médic. des Hôp. de Paris* 1931, nº 21, 16 juin.

27 — Behrend Behrens. — Zur pharmakologie des Blies. — Mitteilung : Uber den Mechanismus des Bleivergiftung von Fischen. *Arch. Exp rim. Pathol. u. Pharm.*, 1928, **137**, 311.

28 — Blume (W.). — Studien zur vergleichenden Pharmakologie das Zentralnervensystems. — Untersuchungen an Fischen. *Arch. Experim. Pathol. u. Pharm.*, 1939, **149**, 186.

29 — Boyer (P.). — Etude de quelques arsénobenzènes sur le poisson d'eau douce (Epinoche). *C. R. Soc. Biol.* 1927, **97**, 1671.

30 — Brehm (A.-E.). — Les Poissons. — Merveilles de la nature. Baillère et fils éd. Paris.

31 — Broun (D.). — Action narcotique des acides alcoyléthylbarbituriques sur les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1928, **99**, 1792.

32 — Carbonaro (G.). — Sopra uno stereoisomero della cocaina : la pseudococaïna destrogyra (psycaina). *Arch. Internat. Pharmacod. et Thérap.* 1927, **33**, 208.

33 — Carpenter (K. E.). — The lethal action of soluble metallic salts on fishes. *Brit. Journ. of Exper. Biol.* 1927, **4**, 378.

34 — Cassaigne (G.M.F.). — Contribution à l'étude de l'action toxique du pH des eaux douces sur quelques poissons. *Trav. du Lab. de Phys. Médic. et Pharm. du Prof.* Sigalas. Bordeaux. 1935. Bière éd.

35 — Chevalier (J.). — Le Pyrèthre.— Les préparations industrielles et pharmaceutiques. — Evaluation de leur activité. *B. S. P.* 1930, **37**, 422.

36 — Clopinsky (A.). —. Den forensisch-chemische narchweis des picrotoxins in tierischen flüssigkeiten. *Inaug. Dissert. Dorpat.* 1883.

37 — Cohen (S. S.) et Githens (T. S.). — *Pharmacothérapeutics.* 1928, 1569.

38 — Cole (A. E.). — Toxicité du méthylmercaptan pour les poissons d'eau douce. *J. Pharm. Exp. Thérapeut.*, 1935, **54**, 393. (*J. P. C.* 1936, **24**, 29).

39 — Cololian (M.). — L'action physiologique des différents sels de soude sur les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1901, **53**, 693.

40 — Combette (R.). et Legendre (R.). — Action de la roténone sur quelques animaux marins. *C. R. Soc. Biol.* 1937, **124**, 49.

41 — Delga (J.). — Etude générale de la toxicité et de la pénétration des composés de l'arsenic chez les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1942, **36**, 799.

42 — Disque (L.). — Beïträge zur Kenntnis der bestandteile und wirkungen des rhizoms von podophyllum. 2 Sitsungsber. Abh. nat. ges. Rostock. N. F. **5**, 1913. (*Reference* 370).

43 — Dissard (M. A.). — Les phénomènes anesthésiques chez les vertébrés aquatiques. *C. R. Soc. Biol.* 1893, **5**, (9e série), 572.

44 — Dissard (M. A.) et Noe (J.). — Résistance des poissons aux substances toxiques. *C. R. Soc. Biol.* 1894, **1**, (10e série), 140.

45 — Dragendorff (G.). — Die gerichtlich-chemische ermittlung von gifte. 1895, 344.

46 — Duquenois (P.). — Expérimentation physiologique de la résine de chanvre indien sur des poissons de petite taille. *B. S. P.* 1939, **46**, 222.

47. — Eichholtz (F.) et Hoppe (E.). — *Arch. f. Exper. Path. u. Pharm.* 1933, **176**, 687.

48 — Fourault (L.). — Contribution à l'étude des modifications du pouvoir anesthésique des solutions de chlorhydrate de para-amino-benzoyl-diéthylaminoéthanol sous l'influence de la stérilisation et de la conservation. *Thèse de Doctorat en pharmac. Paris*, 1941.

49 — Fuhner (H.). — In Abderhalden's Handburch der biologischen Arbeitsmethoden. *Abt.* 4, *Teil* 7, *Heft* 2, *Lief*, 67, *Revised* 1928.

50 — Die wirkungsgrad der einwertigenalkohole. *Zeit. Biol.* 1912, **57**, 465-494.

51 — Nachweis und Bestimmung von Giften auf Pharmakologischen Wege. *Berlin and Wien* 1922.

52 — Gaudin (O.). — Action toxique des pyrèthrines sur les animaux marins. *B. S. P.* 1935, **42**, 145.

53 — Gersdorff (W.-A.). — Contribution from the insecticide division. Bureau of Chemistry and soils. A method for the study of toxicity using Goldfish. *Journ. Amer. Chem. Soc.* 1930, **52** (II), 3440.

54 — Mc. Gill (W.-J.). — Some of the important constituents of digitalis. *Journ. Amer. Chem. Soc.* 1920, **42**, 1893.

55 — Goldsmith (M.). — Réactions physiologiques et psychiques des poissons. *Thèse de Sciences. Paris* 1915.

56 — Coupil (*Cité par Vibert : précis de toxicologie* 1907, 540).

57 — Gueylard (F.). — Résistance des épinoches aux variations de salinité. (Gasterosteus leiurus). *C.R. Soc. Biol.* 1932,**89**, 78.

58 - Gueylard (F.). et Duval (M.). — Toxicité comparée de divers acides pour les poissons. *C. R. AC. Sciences* 1922, **175**, 1243.

59 - Gueylard (F.) et Portier (P.). — Variations de poids de l'épinoche passant d'un milieu dans un autre de salinité différente. *C. R. Soc. Biol.* 1917, **80**, 538.

60 - Variations de poids de l'épinoche morte sous l'influence des changements brusques de salinité. *C. R. Soc. Biol.* 1917, **80**, 683.

61 — Variations de poids de l'épinoche passant de l'eau douce dans des solutions de Chlorure de sodium à différentes concentrations. *C. R. Soc. Biol.* 1922, **87**, 969.

62 — Mc Guigan (H.-A.). — The standardization and action of local anesthetics. *Journ. Amér. Ph. A.* 1924, **13**, 316.

63 - Heckel (H.) et Adams (R.). — Cyclic alkamine esters of paraaminobenzoïc acid. *Journal Américc. Chem. Soc.* 1927, **49**, 1303.

64 Hedon (E.). — Sur l'hémolyse par les glucosides globulicides, et les conditions de milieu qui la favorisent ou l'en empêchent. Toxicité des glucosides hémolytiques pour les poissons et actions antitoxiques. *Arch. Internat. Pharmacodyn.* 1901, **8**, 381.

65 - Heinrich (G.). — Zur kenntnis des biologischen verhaltens von convolvulin und jalapin. *Biochem. Zeit.* 1918, **88**, 13 (référence 370).

66 - Kawamoto (N.). — Les poissons, réactif biologique de l'action de diverses substances chimiques, et recherches sur la nature de l'uréase. *J. Biochem. — Japan.* 1936, **23**, 267-268. (*Bull. Soc. Chim. Fr.* 1937 *fasc.* 8-9, 480).

67 — Kerp (A.). — Die Verhaltnisse beiden Keimemmembranen der Fische. Rochester, Minn. U.S.A. The Mayo Foundation for Médical research. Division of Biochemistry trans. *Faraday Soc.* 1937, **33**, 972-981.

68 - Key (A. B.) and Wells (N. A.). — Anesthésie des poissons par l'amythal. *Journ. Pharm. Exp. Thérap.* 1930, **40** nº 1, 115. (*B. S. P.* 1932, 392).

69 — Knaffl-Lenz (E.). — Die internationalen methoden und standards der biologischen wertbestimmung. 1928.

70 — Knaffl-Lenz (E.). et Hoffman (A.). — Uber die quantitative bestimmung von ascaridol in chenopodiumölen. *Arch. Pharm.* 1929, **267**, 117-128.

71 - Koffler (L.). — Die oberflçähenaktivität und die giftwirkung der saponine. *Biochem. Zeit.* 1922, **129**, 64-72.

72 - Koffler (L.) and Schrutka (W.). — Vergleichende untersunchungen über die tixizität der saponine und die entgiftung durch cholesteri. *Biochem. Zeit.* 1925, **159**, 327-336.

73 – Launoy (L.). — Notions de Pharmacodynamie. Baillère et fils éd. Paris.

74 – Ledebt (S.). — Contribution à l'étude des propriétés biologiques des venins. Action des venins de serpents et des poisons qu'ils engendrent sur quelques vertébrés aquatiques. *Thèse de Sciences. Paris* 1914. Barneoud et Cie impr.

75 – Lendle (L.). — Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Leipzig. Vergleichende Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Wirkung verschiedener Narkotica. *Arch. Fur Exp. Path. u. Pharm.* 1927, **125**, 286.

76 – Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie der Narkose « uber die narkotische Breite ». *Arch. Exp. Pathol. u. Pharm.* 1928, **132**, 214.

77 – Levy (J.). — Etude de l'action de quelques hypnotiques sur diverses espèces de poissons de mer. *C. R. Soc. Biol.* 1927, **97**, 1226.

78 Hypnose et accoutumance des poissons du genre Gobius sous l'influence de quelques hypnotiques de la série barbiturique. *C. R. Soc. Biol.* 1928, **99**, 1325.

79 Dosage biologique des extraits de pyrèthre par détermination de leur toxicité chez le poisson. *Bull. Soc. Thérapeut.* 1933, **38**, 16.

80 – Essais et dosages biologiques des substances médicamenteuses. *Masson et Cie, éd.* 120, bd St-Germain Paris, 1930,Chap. 8, 103

81 Levy (J.) et Cahen (R.). — Sur l'accoutumance de quelques espèces de poissons de mer ou d'eau douce aux hypnotiques. *Bull. Génér. de Thérap.* 1930, **181**, 406.

82 – Levy (J.) et Hamet (R.). — Action de la télépathine sur les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1927, **96**, 1099.

83 – Lhotte (R.). — Influence des variations de salinité sur le rythme cardiaque de la jeune anguille (Civelle). *C. R. Soc. Biol.* 1945, **139**, 27.

84 – Lopez-Lomba (J.). — Poissons réactifs des alcaloïdes. Recherche des conditions optima de réaction, de tension superficielle et de température. *C. R. Soc. Biol.* 1922, **87**, 1168.

85 – Poissons réactifs des alcaloïdes. — Sensibilité maxima et réactions spécifiques de quelques alcaloïdes. *C. R. Soc. Biol.* 1922, **87**, 1268.

86 Les poissons réactifs très sensibles des alcaloïdes. *Thèse de Médecine.* 1922, *Paris.*

87 Maurel et Lagriffe. — Détermination et action des plus hautes températures compatibles avec la vie de certains poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1899, **51**, 797.

88 Détermination et action des plus basses températures compatibles avec la vie de certains poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1899, **51**, 875.

89 – Action comparée de la chaleur et du froid sur certains poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1899, **51**, 915.

90 – Mercier (F.) et Valette (G.). — Pseudococaïne droite et cocaïne gauche. Essais comparés d'anesthésie générale sur les épinoches. *C. R. Soc. Biol.* 1929, **102**, 1016.

91 — Meyer (H. H.) et Gottlieb (R.). — Experimental Pharmakologie and *Amer. from 7th Germ. Ed.* 1926.

92 — Nicolle (P.). — Etude pharmacodynamique de quelques α glycols trisubstitués acycliques, doués de propriétés hypnotiques. *B. S. P.* 1924, **31**, 433.

93 — Osterhout (W. J. V.). — The mesurement of toxicity. *Journ. Biol. Chem.* 1915, **23**, 67-70.

94 — Pittenger (P. S.)). — Preliminary note on a new pharmacodynamic assay method. Carassius aureatus (Goldfish) a test animals for the digitalis series. *Am. Pharm. Assoc.* 1919, **8**, 3893.

95 — Pittenger (P. S.) et Vanderkleed (Ch. E.). — Preliminary note on a new pharmacodynamic assay method. — Carassius aureatus (Goldfish) a test animals for the digitalis series. *Journ. Am. Pharm. Assoc.* 1915, **4**, 427.

96 — Portier (P.). — Travaux scientifiques. 1928 ; Imp. Davy, 52, rue Madame, Paris.

97 — Portier (P.). et Duval (M.). — Variation de la pression osmotique du sang des poissons télostéens d'eau douce sous l'influence de l'accroissement de salinité de l'eau ambiante. *C. R. Ac. Sciences* 1922, **174**, 1366.

98 — Variation de la pression osmotique du sang des sélaciens sous l'influence de la modification de la salinité de l'eau de mer environnante. *C. R. Ac. Sciences* 1922, **174**, 1493.

99 — Variation de la pression osmotique du sang de l'anguille en fonction des modifications de salinité du milieu extérieur. *C. R. Ac. Sciences.* 1922, **175**, 324.

100 — Pression osmotique du sang de l'anguille « essuyée » en fonction des modifications de salinité du milieu extérieur. *C. R. Ac. Sciences* 1922, **175**, 1105.

101 — Portier (P.) et Lopez-Lomba (J.). — Utilisation des poissons de petite taille pour la découverte de faibles quantités de substances toxiques. *C. R. Soc. Biol.* 1922, **87**, 1165.

102 — Powers (Ed. B.). — The Goldfish (Carassius carassius) as a test animal in the study of toxicity. *Illinois Biological monographs* 1917, **4**, n° 2.

103 — Priess et Steglitz (H.). — Pflanzenlaktone als Fischfanggifte. *Berich der Deutsh Pharm. Gesells.* 1911, **21**, 267.

104 — Regnard (P.). — Sur le résultat de l'immersion d'un poisson dans une solution faible de chlorhydrate de cocaïne. *C. R. Soc. Biol.* 1885, **37**, 33.

105 — Action des très basses températures sur les animaux aquatiques. *C. R. Soc. Biol.* 1895, **2**, (10e série), 652.

106 — Regnier (J.). — Méthode de mesure des anesthésiques locaux. *Thèse doct. Méd. Paris* 1929.

107 — Influence de la concentration des ions hydrogène sur un phénomène physiologique, anesthésie de la cornée de lapin par le chlorhydrate de cocaïne. *Thèse doct. ès sciences. Paris*, 1925. Edit. Brulliard, Saint-Dizier

108 — Mesure des anesthésiques locaux. Etude quantitative de l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les fibres nerveuses sensitives. *B. S. P.* 1927, **34**, 641.

109 — Action du chlorhydrate de cocaïne sur les troncs nerveux. Comparaison de l'action sur les fibres sensitives à l'action sur les fibres motrices. *B. S. P.* 1929, **36**, 401.

110 Essai de mesure de l'anesthésie produite sur les terminaisons nerveuses (cornée, muqueuse linguale) par les anesthésiques locaux. Comparaison des pouvoirs anesthésiques. *B. S. P.* 1923, **30**, 580.

111 — Comparaison des pouvoirs anesthésiques de la cocaïne et des principaux succédanés sur les différents éléments nerveux. *Bull., Ac. Méd.* 1929, **102**, 119.

112 — Regnier (J.) et Cardot (H.). — Contribution à l'étude pharmacologique du chlorhydrate de cocaïne. Action sur la chronaxie du nerf moteur. *B. S. P.* 1926, **33**, 10 et 77.

113 — Regnier (J.) et David (R.) — Influence de l'anion combiné à la base cocaïne sur l'action anesthésique de cet alcaloïde. *C. R. Ac. Sciences* 1935, **200**, 1428.

114 Influence de l'acide salifiant les bases anesthésiques sur l'activité de différents sels. Anesthésie et analgésie : 1935, **1**, 285.

115 — Etude de l'activité de divers sels de cocaïne. *J. P. C.* 1935, 8e série, **22**, 16.

116 — Regnier (J.), David (R.) et Bazin (S.) — Influence de l'acide combiné à la cocaïne sur l'action exercée par cet alcaloïde sur les feuilles d'*Elodea canadensis*. Quelques remarques à propos des « actions toxiques potentielles » *C. R. Soc. Biol.* 1939, **131**, 229.

117 — Regnier (J.), Delange (R.) et David (R.). — De l'influence de l'acide combiné à la base sur le pouvoir anesthésique de différents sels de para-amino-benzoyl-diéthylaminoéthanol. *C. R. Ac. Sciences* 1936, **202**, 591.

118 — Regnier (J.) et Quevauviller (A.). — Comparaison de l'activité anesthésique sur un nerf moteur de *Rana esculenta*, de deux sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol, chlorhydrate et phénylpropionate. *C. R. Soc. Biol.* 1936, **122**, 251.

119 De l'influence de la nature de l'acide sur l'action qu'exercent sur le nerf moteur différents sels de la base novocaïne et de morphine ; comportement qualitatif différent suivant les concentrations. *C. R. Ac. Sciences* 1937, **205**, 251.

120 Comparaison de l'action exercée sur l'inhibition du muscle (gastrocnémien de *Rana esculenta*) par des solutions aqueuses de divers anesthésiques locaux. *C. R. Soc. Biol.* 1938, **128**, 1095.

121 Action de divers sels de paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur les filaments myceliens de l'*Ascoïdea rubescens* (Brefeld). *C. R. Soc. Biol.* 1939, **131**, 68.

122 — Regnier (J.) et Valette (G.). — Action du chlorhydrate de cocaïne sur un nerf sensitif, non itératif (nerf lingual du chien, voie sensitive du réflexe linguo maxillaire). *B. S. P.* 1939, **36**, 284.

123 — Richet (Ch.). — Toxicologie des métaux alcalins. — Vie des poissons dans les milieux toxiques. Physiologie. — Travaux de laboratoire de Ch. Richet. 1893, **11**, 409. Félix Alcan éd.

124 — De la toxicité comparée de différents métaux. *C. R. Ac. Sciences*, 1881, **93**, 649.

125 — Influence de la température sur l'intoxication des poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1883, **5**, (7e série), 587.

126 — Durée des phénomènes réflexes dans l'anémie, chez les animaux à sang froid. *C. R. Soc. Biol.* 1883, **5**, 578.

127 — Influence de la pression et de la température sur l'asphyxie des poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1883, **5**, 583.

128 — Expériences sur la vie des poissons dans divers milieux, et sur l'action physiologique des différents sels de soude. *C. R. Soc. Biol.* 1886, **3**, (8e Série), 482.

129 — Des milieux cides ou basiques dans lesquels peuvent vivre les poissons de mer. *C. R. Soc. Biol.* 1886, **3**, 8e Série), 488.

130 — Richet (Ch.), Bachrach (E.) et Cardot (H.). — De l'adaptation des animaux marins à la mise à sec. *C. R. Ac. Sciences* 1928, **187**, 862.

131 — Richet (Ch.), et Oxner. — De l'accoutumance des animaux marins aux eaux sursaturées. *C. R. Ac. Sciences.* 1926, **183**, 627.

132 — Roger (H.). — *Thèse de Paris*, 1887.

133 — Action des organes sur la strychnine. *Pr. Médic.* 15 août 1898.

134 — Action du poumon sur quelques substances toxiques. *Pr. Médic.* 7 juin 1899.

135 — Les fonctions du poumon. — *Pr. Médic.* 5 Oct. 1921, p. 793.

136 — Nouveau traité de Médecine. (Roger, Widal et Tessier), *Fasc.* 6. *Paris, Masson*, 1922.

137 — Rydin Hakan. — Recherche expérimentale sur le renforcement par le pyrogallol de l'effet narcotique de la cocaïne sur Gobius flavescens. *C. R. Soc. Biol.* 1927, **96**, 814 et 816.

138 — Scheiner (H.). — Action narcotique de la novocaïne chez les poissons. *C. R. Soc. Biol.* 1945, **139**, 235.

139 — Sur un procédé de titrage biologique des solutions de novocaïne. *C. R. Soc. Biol.* 1945, 139, 237.

140 — Sigalas (R.). — Action des pyrèthrines sur les animaux marins. *Gaz. des Sciences Médic. de Bordeaux.* 1932, nº 50, 787.

141 — Sollman (T.). — A Manual of Pharmakology 3rd ed. 1928.

142 — Steidle (H.) et Durr (H.). — Beiträge zur Pharmakologie der Seltenen Erdmetalle. *Arch. Exp. Pathol. u. Pharm.* 1929, **145**, 20.

143 — Tchang-Si. — Résistance aux variations de température chez les animaux marins. *C. R. Soc. Biol.* 1937, **116**, 1056.

144 — Tchang-Si et Sommery. — Résistance de quelques bleniidés à la variation de salinité. *C. R. Soc. Biol.* 1931, **108**, 1236.

145 — Tiffeneau (M.) et Broun (D.). — Influence de la température sur la production de l'anesthésie par le bromure de propyle, et sur la teneur de l'encéphale en produit anesthésique. — Etude chez le Goujon maintenu à 15º et 25º. *C. R. Soc. Biol.* 1937, **125**, 989.

146 Influence des ions H et OH sur l'action anesthésique du bromure de propyle chez l'Epinoche. *C. R. Soc. Biol.* 1935, **119**, 1382.

147 Tiffeneau (M.) et Cahen (R.). — Influence de la teneur en molécules acides ou alcalines sur l'action anesthésique du bromure de propyle chez le Goujon. *C. R. Soc. Biol.* 1939, **130**, 1220.

148 Influence des variations de la température sur la production de l'anesthésie par le bromure de propyle. Teneur de l'encéphale en substance anesthésique. Etude chez le poisson (Goujon) maintenu entre + 5° et + 25°. *C. R. Soc. Biol.* 1938, **128**, 1058.

149 Tiffeneau (M.), Dogny et Sommaire. — Des relations entre le pouvoir hypnotique des acides barbituriques substitués et leur coefficient de partage entre l'eau et les corps gras. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1923, **5**, 179.

150 Tiffeneau (M.) et Dorlencourt (H.). — Sur une nouvelle série d'hypnotiques, les aryldialcoylglycols. *C. R. Ac. Sciences* 1923, **176**, 1343.

151 Tiffeneau (M.), Levy (J.). et Broun (D.). — Influence de l'acidité ou de l'alcalinité des solutions d'avertine sur l'anesthésie provoquée par cette substance chez la Tanche. *C. R. Soc. Biol.* 1933, **116**, 1507.

152 Influence des modifications de la réserve alcaline et du pH sur l'action des hypnotiques. *Bull. Soc. Thérap.* 1930, **35**, 203.

153 Influence exercée par les variations de la réaction du milieu intérieur chez l'Epinoche sur l'action d'un hypnotique barbiturique ; le sonéryl. *Paris Médical.* 1930, **75**, 583 ; 1930, 38, 463.

154 Tiffeneau (M.) et Torres (C.). — Sur les propriétés hypnotiques de l'hydrobenzoïne et de ses homologues alcoylés (diarylglycols symétriques). Relations entre l'activité physiologique et le P. M. *C. R. Ac. Sciences* 1924, **178**, 237.

155 Unger. — Uber den Einflenss der Temperatur auf Wurkungsstärke und Oberflächenaktivität der Narkotica. *Biochem. Zeit.* 1918, **89**, 238-150.

156 Valette (G.). — Toxicité des sels biliaires pour les poissons. Importance du pouvoir tampon des solutions utilisés. *C. R. Soc. Biol.* 1941, **135**, 735.

157 Action favorisante des savons sur la toxicité de la strychnine pour l'épinoche. *C. R. Soc. Biol.* 1943, **137** ; 114.

158 Toxicité de différents savons pour l'épinoche. Pouvoir hémolytique. Influence du pH. *C. R. Soc. Biol.* 1941, **135**, 1540.

159 Verda (D. J.). et Elhardt (W. P.). — Approximate method for determining the same degree of anesthesia for fish. *Sciences N. Y.* 1930, **II**, 581.

160 Wasicky (R.). — Zur bilogischen Wertbestimmung von Filiximas. *Arch. Fur Exper. Pathol. u. Pharm.* 1923, **97**, 454.

161 Wasicky (R.) und Becker (J.). — Weitere beïtrage zur biologischen Wertbestimmung von Filiximas. *A. E. P. P.* 1924, **103**, 311, 321.

TABLE DES MATIÈRES

pages

INTRODUCTION. 1

CHAPITRE PREMIER. — Utilisation des poissons dans les essais biologiques 7

CHAPITRE II. — Technique utilisée. — Application à l'étude des Chlorhydrates de cocaïne. 55

CHAPITRE III. — Action de différents sels de Paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol sur Gasterosteus Aculeatus. 89

CHAPITRE IV. — Action de divers Anesthésiques locaux sur les poissons. — Mode d'Action : Anesthésie ou toxicité. 139

CONCLUSIONS 181

BIBLIOGRAPHIE 189

IMPRIMERIE COMMERCIALE
DU
NOUVELLISTE
14, Rue de la Charité - LYON

O. P. L. 31.3603
N° d'Imprimeur : 3.033
Dépôt Légal : 2e trimestre 1946

ERRATA

Page 75 : onzième ligne, et page 96, tableau XII : lire : *chlorhydrate de cocaïne.*

Page 91, tableau IX, et page 98, tableau XIII : lire : *paraaminobenzoyldiéthylaminoéthanol.*

Page 140, neuvième ligne : lire : *benzoyl-diméthylamino-diméthyl-éthyl-carbinol.*

Table des matières : Chapitre II : lire : *du Chlorhydrate de cocaïne.*